

Možnosti a význam prodloužené kultivace embryí

Potential and significance of extended embryo
culture

MUDr. Petr Uher



Dizertační práce

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 – ta ale pro zvýšení úspěšnosti léčby nesplnila očekávání.

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 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.

Předmluva

Tato práce vznikla ve spolupráci Gynekologicko – porodnické kliniky, Fakultní nemocnice v Plzni, Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni a reprodukčního centra, IVF Zentren Prof. Zech-Pilsen a Karlsbad.

Rád bych poděkoval svému školiteli Doc. MUDr. Zdeňku Rokytovi, CSc. a přednostovi Gynekologicko - porodnické kliniky FN Plzeň Doc. MUDr. Z. Novotnému, CSc. za jejich odborné vedení a dohled na práci.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně a veškeré převzaté údaje řádně citoval.

MUDr. Petr Uher

Půjčování práce

Dizertační práci je možné zapůjčit ve středisku vědeckých informací Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Plzni dne

MUDr. Petr Uher

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Souhrn současných poznatků.....	10
3.1	Vývoj embrya před implantací	10
3.1.1	Oocyt.....	10
3.1.2	Zygota	12
3.1.3	Buněčné stádium embrya.....	13
3.1.4	Blastocysta	14
3.1.5	Implantace embrya.....	15
3.2	Prodloužená kultivace embrya – definice, historie. Význam a využití prodloužené kultivace.....	17
3.2.1	Dokonalejší selekce embryí s cílem zvyšování efektivity IVF	18
3.2.2	Analýza kultivačních médií s cílem zvyšování efektivity IVF	19
3.2.3	Preimplantační genetická diagnostika a preimplantační genetický screening.....	21
3.2.4	Derivace embryonálních kmenových buněk (EKB)	31
4	Souhrn vlastních výsledků	33
4.1	Studium interakcí embryonálních kmenových buněk a hematopoetických kmenových buněk.....	33
4.1.1	Materiál a metodika	33
4.1.2	Souhrn výsledků a jejich diskuze	35
4.2	Jsou embrya vybraná 3. den kultivace dle morfologických kritérií shledána také jako geneticky vhodná k ET?	37
4.2.1	Materiál a metodika.....	37
4.2.2	Souhrn výsledků a jejich diskuze	39
4.2.3	Závěr.....	40
4.3	Přínos kultivace do stádia blastocyst pro zvýšení úspěšnosti léčení neplodnosti	41
4.3.1	Materiál a metodika.....	41
4.3.2	Souhrn výsledků a jejich diskuze	41
4.3.3	Závěr.....	43
4.4	Zvyšování efektivity a spolehlivosti PGS metodou rehybridizace pomocí subtelomerických sond.....	44
4.4.1	Materiál a metodika.....	44
4.4.2	Souhrn výsledků a jejich diskuze	46
5	Závěry pro praxi a výhled do budoucna.....	49
6	Literatura	51
7	Tabulky, schémata, obrázky	69
8	Přílohy	80

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 ovlivňuje 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.

Práce popisuje současný stav vědění na tomto poli medicíny a předkládá některé aktuální výsledky našeho výzkumu v této oblasti.

MUDr. Petr Uher

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 stádia blastocyst jak pro zvýšení úspěšnosti léčby sterility, tak pro možnost jejího využití pro preimplantační genetické vyšetření.

V kapitole „Souhrn současných poznatků“ autor usiluje o doložení teoretických předpokladů, přehled vývoje a důkazů výhodnosti těchto technik.

Na základě vlastních výsledků vycházejících z několikaletých zkušeností s dlouhodobou kultivací se experimentální část zabývá:

1. Zvýšením úspěšnosti léčby sterility metodou kultivace do blastocyst a pozitivní přínos preimplantační diagnostiky.
2. Možností kontroly výsledků metody FISH v preimplantační genetické analýze s cílem obhájit spolehlivost a významnost této metody.
3. Možnostmi další kokultivace a diferenciací embryonálních kmenových buněk.

V závěru autor klade důraz na nutnost dalšího výzkumu neinvazivních technik stanovení viability embrya, které jsou umožněny právě předpokladem dokonalé dlouhodobé kultivace embryí do stádia blastocyst.

3 Souhrn současných poznatků

3.1 Vývoj embrya před implantací

3.1.1 Oocyt

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.

V průběhu oogeneze je mateřská mRNA kontinuálně transkribována a akumulována v rostoucím oocytu a její transkripce se těsně před dosažením zralosti oocytu zastavuje. Akumulovaná mateřská mRNA je pak používána k syntéze proteinů v průběhu meiotického zrání oocytu a dokonce v průběhu vývoje embrya po fertilizaci. Molekuly mRNA, které jsou klíčové pro oogenezu, ale nikoli pro časný preimplantační vývoj, jsou po fertilizaci rychle degradovány [Alizadeh et al., 2005].

U *in vitro* maturovaných oocytů byla pomocí microarray technologie prokázána dvojnásobně větší exprese - přes 3000 transkriptů. To je především výsledek započetí nové transkripce (jenž je za normálních okolností neaktivní do opětovného zahájení meiózy), dále polyadenylace transkriptů (jenž měly být rovněž neaktivní) a selhání deadenylačního a degradačního procesu. Mnoho z těchto transkriptů je zapojených v buněčném cyklu a jeho regulaci. Například přítomnost zvýšeného množství genů regulujících kontrolní body dělicího vřeténka může způsobit selhání správné tvorby bipolárního vřeténka během meiózy. Výskyt vysokých hodnot aneuploidie u embryí, která vznikla z *in vitro* maturovaných oocytů, koreluje s nálezem poruchy regulace exprese klíčových genů v buněčném cyklu, zvláště pak těch, jenž regulují strukturu a organizaci dělicího vřeténka/mikrotubulů [Jones et al.,

2007]. Významnou roli ve vývoji oocytů a embryí hrají také primordiální mitochondrie a jejich správná genová exprese [Thouas et al., 2007; Jansen et al., 2007].

První polární tělísko (1. PB) obsahuje polovinu genetického materiálu, takže oocyt je haploidní. V tomto stádiu je obklopen zonou pellucidou (ZP) a 1. PB je lokalizováno v prostoru mezi oocytem a ZP.

Následně po fertilizaci a aktivaci oocyty vstupuje oocyt do druhého meiotického dělení, ve kterém dojde k rozdělení duplikovaných chromatid haploidního oocyty. Jedna sada zůstane v oocyty a druhá je vyloučena jako druhé polární tělísko. Během těchto procesů dochází k častým chybám.

Tým doktora Verlinského ve své souborné práci [Kuliev A. et al., 2007] prezentuje výsledky incidence aneuploidie v lidské oogenezi. Bylo testováno přes 20 000 oocytů od IVF pacientek nad 35 let a zjistili, že pouze polovina oocytů byla euploidních. Došli k závěru, že z aneuploidních oocytů je 42 % aneuploidních po prvním meiotickém dělení, 37,3% po druhém a 29,1% jak po prvním, tak po druhém.. Téměř polovina oocytů s chybou v meióze I bude mít zároveň chybu v meióze II. Převážná většina embryí vzniklých z těchto oocytů je abnormálních pro ten samý nebo jiný chromozóm, nebo je mozaických, což naznačuje sklon k mitotickým chybám.

Hodnota aneuploidíí nebyla pro všechny chromozómy stejná. Vyšší prevalence byla popisována u chromozómů 21 a 22. Rovněž původ aneuploidie jednotlivých chromozómů není náhodný. Chyby chromozómů 16 a 22 vznikají převážně v meióze II; chromozómu 18 v meióze I a chromozómů 13 a 21 podobně v meióze I a II. Počet aneuploidíí v oocytech pozitivně koreluje s maternálním věkem [Kuliev et al., 2007].

Doktorka Semra Kahraman [Kahraman et al., 2007] analyzovala vztah mezi morfologií oocytů a aneuploidie v vzniklých embryích. Mezi embryi pocházejícími z oocytů s normální morfologií bylo 41,3% embryí aneuploidních, mezi embryi z oocytů s různými intracytoplasmatickými abnormalitami 52,4% a mezi embryi z oocytů s extracytoplasmatickými abnormalitami 54,9%. Nejvyšší procento aneuploidíí bylo nalezeno u embryí pocházejících z oocytů s mnohočetnými vakuolami - 71,4%. Přítomnost mnohočetných vakuol a hladkého endoplasmatického retikula byly silně asociovány s chromozómálními abnormalitami.

3.1.2 Zygota

Po splynutí gamet, pozorovaném po in vitro fertilizaci (IVF) nebo po intracytoplazmatické injekci spermie (ICSI) popřípadě po intracytoplazmatické mikroskopicky kontrolované injekci spermie do vajíčka (IMSI) dojde k aktivaci oocytu. Během několika hodin dojde k vyloučení druhého polárního tělíska (2 hodiny po ICSI) a formaci prvojader (již 5 hodin po ICSI), kdy fyziologicky fertilizovaný oocyt obsahuje jedno prvojádro

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). Chromozómální materiál paternálního a maternálního původu je vyměněn v procesu zvaném homologní rekombinace nebo také crossing-over (= výměna genetického materiálu mezi páry nesesterských chromatid homologních chromozómů).

Patologicky fertilizovaný oocyt má odlišný počet prvojader, podle kterého můžeme usuzovat na chromozómální konstituci zygoty. Jedno prvojádro naznačuje, že se jedná o zygotu s haploidní sadou chromozómů, tři prvojádra naopak naznačují, že zygota obsahuje triploidní sadu chromozómů. Není to však absolutní pravidlo - 3% embryí bez prvojader a 5% embryí s jedním prvojádrem může mít euploidní karyotyp [Noyes N. et al., 2007]. Naopak přítomnost dvou prvojader nezaručuje normální proces fertilizace a rovněž negarantuje, že jedno prvojádro je od matky a druhé od otce.

V práci doktorky Semry Kahraman [Kahraman et al., 2007] byla potvrzena korelace mezi morfologií prvojader a chromozómálními abnormalitami. Pre - embrya byla klasifikována do dvou kategorií v závislosti na uspořádání, velikosti, lineárním nebo nepravidelném uspořádání jadérek a dále na pozici a velikosti prvojader v cytoplasmě. V první kategorii byly vyhodnocovány morfologické znaky jadérek a v druhé morfologie prvojader. Bylo potvrzeno, že abnormální morfologie prvojader koreluje s nízkou hodnotou tvorby blastocyst, s tvorbou arestovaných, pomalu se vyvíjejících chromozómálně abnormálních embryí. Statistická analýza potvrdila silnou korelaci mezi morfologií prvojader a jadérek a aneuploidii v embryích i v jiných publikovaných studiích [Gianaroli et al., 2003; Gianaroli et al., 2007, 2007a].

3.1.3 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 myši ve stádiu dvou blastomer, u prasat ve stádiu čtyř blastomer a u ovcí ve stádiu osmi blastomer [Braude et al., 1988]. U člověka je tento proces zatím ne zcela objasněn.

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].

Během fertilizace jsou prvojádra s viditelnými jádérky polarizována a mitochondrie začnou agregovat okolo prvojader. Rovina prvního buněčného dělení je dána pozicí druhého polárního tělíska, jež slouží jako tzv. marker polární osy od zygoty do stádia blastocysty.

Proces rýhování lidských embryí zahrnuje sérii mitotických dělení buněk. Průměrná doba prvního buněčného dělení je 20 hodin. Průměrná doba buněčného cyklu mezi dny 2 a 6 je 31 hodin. Jako u všech savců, centrozóm lidské spermie kontroluje první mitotické dělení po úspěšné fertilizaci. Ve stádiu 2 - 8 buněčného embrya je dělení zcela závislé na zásobách maternální RNA nutné k translaci a syntéze důležitých proteinů. Načasování snížení poměru proliferace se shoduje s načasováním aktivace embryonálního genomu, jenž se u člověka objevuje pravděpodobně mezi 4 a 8 buněčným stádiem. V IVF praxi dobře se vyvíjející embrya dosáhnou 4 a 8 buněčného stádia v den 2 až 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 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.

Bylo prokázáno, že dopad biopsie jedné buňky na vývoj embrya do stádia blastocysty je minimální u normálně, synchronně se vyvíjejících embryí, oproti

embryím, jež byla považována za embrya ne zcela optimální kvality a v době biopsie měla méně než sedm buněk [Dorfman et al., 2007].

Ještě před 10 lety se předpokládalo, že v tomto stádiu jsou všechny buňky totipotentní a embrya ještě nekompaktují [Hardy et al., 1990]. Od roku 2000 se však objevují práce popisující rozdílné exprese Oct-4 (marker totipotence, typický pro buňky embryoblastu) a β -hCG (marker trofoblastu) na různých blastomerách [Hansis et al., 2001, 2002]. Naproti tomu ale odběr jedné blastomery před 4. buněčným stádiem embrya má za následek poškození dalšího vývoje a vede k redukci celkového počtu buněk embryoblastu [Tarin et al., 1992].

Kvalita 2 – 16-ti buněčných embryí vzniklých po IVF je různorodá. Mnoho z embryí obsahuje buněčné fragmenty nebo nerovnocenné blastomery v jejich velikosti, popřípadě vykazuje rychlejší nebo pomalejší načasování buněčného dělení. Fragmenty vznikají z důvodu neustálé změny velikosti blastomer a tvorby a zániku buněčných kontaktů během dělení. Jestliže přesáhne stupeň fragmentace 10% objemu embrya, pak to pravděpodobně odráží jisté aberace v embryonálním vývoji.

Juriscova [Juriscova et al., 2003] ve své studii jasně prokázala, že v arestovaných fragmentovaných embryích je spuštěn proces apoptózy, který může být zodpovědný za eliminaci buněk nesoucích chromozomální abnormalitu - například u monosomií [Magli et al., 2000].

Studie Staessena [Staessen et al., 2004] a Giorgettiho [Giorgetti et al., 2007] ukázaly nízké hodnoty implantace (5%) po transferu embryí s 10 - 50% fragmentacemi v den 2. Mezi fragmenty je řada rozdílů a bylo potvrzeno, že rozdíl v implantaci embryí je pravděpodobně důsledek spíše typu fragmentů než stupně fragmentace samotné [Alikani et al., 1999].

3.1.4 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 blastomery.

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. Tight junction a desmosom - like struktury mohou být pozorovány mezi lidskými blastomerami v šestibuněčném a osmibuněčném stádiu, zatímco gap junctions se objevují ve stádiu blastocysty. Výsledky souhlasí s představou, že pouze embryo, které vykazuje organizovaný model intercelulárních spojení, je schopné přežít. Nástup pevných spojení mezi blastomerami je relativně časný, zatímco plná kompaktace se neobjeví, dokud embryo nemá 16 - 32 buněk s následnou formací dutinky a expanzí blastocoely. Kavítace rovněž zahrnuje kumulaci tekutiny v dutince, jenž je transportována buňkami trofoektodermu [Schoolcraft et al. 1999; Gardner et al. 1997].

3.1.5 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.

Podmínky pro úspěšnou implantaci jsou tři: optimálně vyvinuté životaschopné embryo či embrya, adekvátně připravené endometrium a jejich vzájemná komunikace a reciproční ovlivňování.

Morfologické a funkční změny endometria v průběhu menstruačního cyklu jsou regulovány ovariálními steroidními hormony. Tyto hormony jsou rozhodujícím faktorem a při jejich chybění ke změnám sliznice nedochází. Jejich efekty, to znamená molekuly, jejichž expresi ovlivňují, a které pak zabezpečují vlastní morfologické a funkční změny endometria, však již tak přesně popsány nejsou. Mnoho z nich je známo, ale mnoho dalších se každým rokem objevuje v literatuře zcela nově.

Savčí embrya se nemohou vyvíjet bez fungující placenty. Endotel, imunitní a endokrinní systém se společně s reprodukčním systémem ženy přímo účastní procesu implantace, vzniku placenty a udržení těhotenství. Jejich koordinace je

zajišťována souhrou endokrinního a imunitního systému - morfologická a funkční přestavba endometria je podmíněna endokrinně a zajišťována lokálně produkovanými regulačními faktory, z velké části cytokiny a růstovými faktory [Tabibzadeh, 1998].

Kromě toho, že placenta zabezpečuje přežití a vývoj embrya, ovlivňuje též mateřský organismus, jeho metabolismus, endokrinní i imunitní systém, a to tak, aby to co nejvíce prospívalo vývoji embrya a plodu. Tyto komplexní aktivity jsou vysoce senzitivní, což dokazuje vysoké procento časných spontánních potratů [Cross et al., 1994].

V současné době jsou známy desítky růstových faktorů, transformačních růstových faktorů, adhezivních molekul a cytokinů, které v adhezivní fázi implantace spouštějí přípravné procesy pro přijetí embrya a v invazivní fázi zajišťují a uskutečňují vzájemné buněčné kontakty. Tyto molekuly mohou být jak maternálního, tak embryonálního původu [Dominguez et al., 2003; Herrler et al., 2003; Tabibzadeh, 1998; Bornstein et al., 2004]. Cytokiny jsou regulační glykoproteiny, které přenášejí informaci jednak uvnitř imunitního systému a jednak mezi imunitním systémem a ostatními tkáněmi. Některé cytokiny se svými receptory jsou specifické pro fetoplacentární spojení [Vinatier et al. 1992] a jak ukazuje stále rostoucí počet publikací, jsou to právě tyto molekuly, jež uskutečňují klíčovou část embryo-maternálního dialogu [Saito, 2000; Saito, 2001; Chaouat et al., 2002; Chaouat et al., 2004].

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 signalizačními vektory, produkovanými endometriem [Stewart et al., 1992; Stewart, 1994; Charnock-Jones et al., 1994; Vogliagis et al., 1996; Vogliagis et Salamonsen, 1999; Tsai et al., 2000; Nardo et al., 2003; Dominguez et al., 2003; Giudice, 1999; Herrler et al., 2003; Tabibzadeh, 1998; Kimber, 2005].

Expresí cytokinů v endometriu bývá detekována imunohistochemicky či běžnými blottingovými metodami [Charnock-Jones et al., 1994; Cullinan et al., 1996]. Poněkud obtížnější je technika uterinních výplachů, v nichž jsou cytokiny analyzovány většinou pomocí enzymatické imunoanalýzy (ELISA) [Hambartsoumian, 1998; Piccinni, 2001; Mikolajczyk et al., 2003]. Ačkoliv se jedná o invazivní vyšetřovací metodu, bylo

prokázáno, že tyto výplachy nijak negativně neovlivňují schopnost otěhotnění [Ledee-Bataille et al., 2004].

Angiogeneze v endometriu je klíčový proces tohoto období. Je řízen jak autokrinně z epitelí a stromatu endometria, tak faktory produkovanými embryem [Kapiteijn et al., 2006]. Jedním z velmi potentních angiogenních faktorů, jež embryo secernuje po kontaktu s endometriem v hojném množství, je systém interleukinu 1 (IL-1), jehož jednotlivé komponenty jsou exprimovány jak na preimplantačních myších embryích, tak na embryích lidských. Receptor pro IL-1 je exprimován na endometriu téměř všech savčích druhů a u většiny z nich antagonizace biologického efektu IL-1 vede k selhání implantace. To lze vysvětlit jak působením IL-1 na systém metaloproteináz a jejich inhibitorů (MMPs/TIMPs), tak na stimulaci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který podporuje angiogenezi [Krussel et al. 2003].

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.

Selhání implantace embrya může být příčinou idiopatické, tj. standardními vyšetřovacími metodami nevysvětlitelné infertility, která je diagnostikována u 10 - 15% neplodných párů. Podílí se na opakovaném selhání léčby neplodnosti a v případech chybné placentace může vést k opakovanému potrácení, preeklampsii a růstové retardaci plodu.

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. Např. Olivennes a kolektiv využívali Vero buněk izolovaných ze zvířecích tkání [Olivennes et al., 1994]. Tyto systémy však měly mnoho rizik – především přenos virů a prionů ze zvířecích tkání, a tak byla intenzivně hledána cesta k syntetickým, definovaným médiím.

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. Této problematice se budeme věnovat v kapitole 3.2.1.

Ani prodloužená kultivace však nezvedla úspěšnost léčby na dostačující úroveň. Z toho vyplývá tedy největší úkol pro současnou reprodukční medicínu – doplnit k morfologickému hodnocení životaschopnosti embrya (které tedy zřejmě není dostatečné v evaluaci vývojového potenciálu embrya) nějaký další, přídatný test, nejlépe rychle proveditelný a neinvazivní, jehož by bylo možno plošně zavést, a který by vedl ke zvýšení efektivity léčby neplodnosti, nejlépe bez vedlejších účinků. Této problematice se budeme věnovat v kapitole 3.2.2 a 3.2.3.

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 and 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; Wilson et al., 2002; Gardner et al., 2004; Nyboe-Andersen et al., 2004; 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; Gardner et al, 2003]. Tato synchronizace byla prokázána např. studií sledující uterinní kontraktilitu – byla poloviční v době transferu blastocysty než u žen s transferem 2. den [Fanchin et al, 2001; Gardner et al, 2003].

Význam synchronizace vývoje embrya a připravenosti endometria je podporována řadou studií, popisujících molekulární dialog v průběhu implantace [Galan et al, 2000].

Studie prokazují, že např. u žen mladších než 36 let, které podstupují svůj první či druhý cyklus IVF, je transfer jedné blastocysty signifikantně úspěšnější než transfer jednoho embrya v den 2 či 3 [Emiliani et al., 2003; Van Monfoort et al., 2006; Papanikolaou et al., 2006].

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. Žádné zvýšení efektivity IVF se na podkladě imunologických stanovení zatím bohužel nekonalo, a to ani u tak slibných jevů, jako byla detekce solubilní HLA-G v kultivačních médiích embrya. Tato vyšetřování byla opakovaně potvrzována v mnoha publikacích jako jasný a vysoce korelující prediktivní faktor [Fisch et al., 2007; Desai et al., 2006], přesto však multicentrická studie z roku 2009 publikovaná v RBMO prokázala, že tato metoda funguje pouze při určitých

kultivačních podmínkách a plošně aplikována být zatím rozhodně nemůže [Tabiasco et al., 2009].

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, 1999; Verlinski, 1990], jako alternativa prenatalní 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.

Úspěšný program PGD/PGS vyžaduje vysoce kvalitní IVF, dostatečné mikromanipulační schopnosti k získání genetického materiálu (polární tělíška, blastomera, trofoektoderm) a sofistikované molekulární technologie. Proto PGD/PGS, tak jak ji známe nyní, je výsledek úzké spolupráce mezi klinickými a molekulárními genetiky, gynekology a embryology [Geraedts et al., 2001].

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]

Chromozomální abnormality embrya a přínos PGD/PGS v jejich detekci

Wilcox a spolupracovníci [Wilcox et al., 1988] provedli studii, při níž u mladých zdravých žen stanovovali denně hCG z moče počínaje dobou implantace a zjistili, že celková ztráta časných těhotenství do 7. týdne je 16 %.

Další studie popsaly hodnoty klinicky rozpoznatelných těhotenských ztát v prvním trimestru okolo 10 – 12%. Maternální věk s tímto rizikem pozitivně koreluje. U žen, jež mají v anamnéze 3 a více opakovaných potratů vzrůstá rizika dalšího potratu na 30% [Brigham et al., 1999].

Různé studie spontánních potratů prokázaly, že více jak polovina z nich je spojena s chromozomálními abnormalitami [Stern et al., 1996]. Řada autorů se ale domnívá, že tato hodnota je ještě vyšší – 70 až 90% [Pellicer et al., 1999, Carp et al., 2001].

Studiem genetické konstituce preimplantačních embryí bylo zjištěno, že frekvence chromozomálních abnormalit, především aneuploidií, je v embryích velmi vysoká: 25 - 80 % ze všech embryí je aneuploidních. Pokud selektujeme embrya dle běžně uznávaných morfologických kritérií, pak z morfologicky normálních embryí je stále ještě 50% chromozomálně abnormálních [Pellestor et al., 1994]. Chromozomální abnormality, především haploidie a polyploidie, souvisí se špatnou morfologií embrya [Ziebe et al., 2003; Sermon et al., 2004]. Bylo zjištěno, že 80 % fragmentovaných embryí a 90 % embryí, jejichž vývoj byl zastaven v některém z preimplantačních vývojových stádií, nese chromozomální abnormalitu [Magli et al., 2007]. Rovněž přítomnost vícejaderných blastomer vede k zastavení vývoje embrya, k rozsáhlému mozaicismu nebo polyploidii (74 %) [Kligman et al., 1996].

Použitím specifických fluorescenčně značených DNA sond bylo prokázáno, že nejčastější chromozomální abnormalitou jsou trisomie chromozómů 21, 13, 16, 18, 22 (50 %) a početní abnormality pohlavních chromozómů X a Y (20 %) [UNESCO/IBC, 2003]. 25% případů připadá na celkovou polyploidii a 5 % na nebalancované chromozomální přestavby. Proto vyšetření aberací chromozómů embrya, které jsou nejčastěji nalézány ve spontánních potratech (13, 16, 18, 21, 22, X a Y), může předejít spontánnímu potratu a tak zvýšit úspěch umělého oplodnění. Vyšetření těchto sedmi chromozómů odhalí 70 % všech možných abnormalit [Boué A. et al., 1985].

Procento aneuploidií v ocytech i embryích vzrůstá s maternálním věkem (ze 67% u pacientek pod 38 let na 75% u pacientek nad 38 let) [Munné et al., 1994, 1998, 2007a,b, 2009; Magli et al., 2007; Gianaroli et al., 2007].

Proto strategie zlepšení úspěšnosti IVF/ICSI může zahrnovat (jako jednu z možných cest) mimo mikroskopické hodnocení morfologie, dynamiky dělení a vývoje embryí *in vitro* do stádia blastocysty, také provedení PGS k vyloučení aneuploidních embryí [Staessen et al., 2004].

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]. Avšak u pacientek, jež měly více jak 5 předchozích potratů, nebylo pozorováno žádné zlepšení díky PGS. Naproti tomu 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-, teratozoospermií je signifikantní nárůst aneuploidie přibližně 4 x (zvláště chromozómů 1; 12; X a Y) a disomie přibližně 3 x (chromozómy 1; 13; 21; 22; X a Y) oproti kontrolním (plodným) mužům [Martin et al., 2007]. Nejvíce je zvýšená frekvence aneuploidií chromozómů G skupiny (21 a 22) a X - Y bivalentů, což bylo prokázáno jak karyotypováním, tak FISH analýzou.

Mnoho aneuploidií pohlavních chromozómů pochází z paternální nondisjunkce [Hassold et al., 1988; Jacobs et al., 1988; May et al., 1990]. U těchto pacientů byl prokázán signifikantní nárůst frekvence chromozomálních abnormalit po ICSI a bylo zjištěno, že všechny abnormální karyotypy v počtu gonozómů byly paternálního původu [Van Opstal et al., 1997]. 8,2% mužů s počtem spermií nižším než 5 mil/ml trpí mikrodeleci Y chromozómu [Devroey et van Steirteghem, 2004]. Tyto mikrodelece vznikají většinou *de novo* a jsou přenášeny na všechny mužské potomky při ICSI, což může opět vést k jejich snížené plodnosti [Johnsons et al., 1998; Bernardini et al., 1998; Pang et al., 1999; Burrello et al., 2003].

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 s opakovanými aborty 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; Wilton, 2002, 2005, 2007; Sermon et al., 2005; Ruangvutilert, 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].

Metodika PGS/PGD

Základním bodem PGD/PGS je odběrem nesnížit implantační a vývojový potenciál embrya. V souvislosti s vývojovými stádii dnes existují 3 odlišné, dobře zavedené, procedury biopsie - odběr polárních tělísek (PB) z oocyty (1. polární tělísko) nebo zygoty (2. polární tělísko), biopsie v nejlépe osmibuněčném stádiu embrya (odběr jedné či dvou blastomer 3. den po oplodnění) a odběr trofoektodermu ve stádiu blastocysty.

Vlastní odběr PB a blastomer je ve velké většině prováděn pomocí aspirace. Účinnost a bezpečnost těchto procedur byla potvrzena na zvířecích modelech. Žádná z procedur výrazně nezasahuje do dalšího *in vitro* a *in vivo* vývoje embrya, nesnižuje hodnoty implantace a hodnoty pregnancy rate (PR).

Hlavní výhodou biopsie PB je, že nesnižuje u oocytů schopnost fertilizace a procenta dělicích se embryí [Verlinski et al., 2002]. Odběr polárních tělísek je využíván především v Německu, v Rakousku a v Itálii, kde je zakázána biopsie embrya [Ethikrat, 2004].

Hlavní limitací analýzy polárních tělísek je fakt, že hodnotíme pouze maternální genetický příspěvek.

První polární tělísko podléhá rychlé degeneraci a proto je FISH analýza doporučována pouze tehdy, je-li možné PB odebrat do 6- ti hodin od odběru oocytů. Druhé PB přežívá mnohem déle [Verlinsky et al., 2005; Rechitsky et al., 1999].

Ideální dobou k odběru blastomery by měl být 3. den po fertilizaci, kdy by embryo mělo být osmibuněčné [Handyside et al., 1989]. Ne všechna embrya však dosáhnou osmi buněčného stádia třetí den po oplození, takže do biopsie můžeme zahrnout i 6-ti buněčné embryo, ale musíme vzít v úvahu, že se pravděpodobně jedná o embrya ne zcela optimální kvality [Thornhill et al. 2005].

Odebraná blastomera by měla být intaktní a měla by obsahovat jedno jasně viditelné jádro. Bohužel buněčná lýza se může objevit v jakémkoliv kroku procedury.

Ačkoliv normální lidské embryo obsahuje jedno jádro v každé blastomeře, byl popsán jev multinukleace a to jak v *in vitro*, tak *in vivo* embryích. Jev multinukleace je vysvětlován různými mechanismy: karyokineze bez cytokineze, částečná fragmentace jádra či defektní migrace chromozómů v anafázi mitózy. Incidence anukleovaných blastomer je rovněž hodně vysoká, zejména pak v embryích se špatnou morfológií. Hodnota tvorby blastocyst by měla být zaznamenávána jako kritérium bezpečnosti procedury biopsie.

Data z klinických studií bioptovaných embryí ukazují, že přibližně jedna čtvrtina cyklů končí úspěšným otěhotněním. [Gianaroli et al., 2002b; Sermon et al., 2005].

Výhodou odběru buněk trofoektodermu je fakt, že můžeme odebrat 10 až 30 buněk k analýze. Naopak hlavní limitací PGD ve stádiu blastocysty jsou naše nedostatečné znalosti o tom, do jaké míry reprezentuje trofoektoderm zbytek embrya. Bohužel zatím neexistuje studie porovávající genetické složení trofoektodermu a embryoblastu lidské blastocyty. Další nevýhodou je nedostatek času na provedení genetické analýzy v době, kdy chceme již blastocystu transferovat [Sermon et al., 2004].

Otevření ZP je možné jak mechanicky tak laserem, po následné kultivaci a vyřeznutí trofoektodermu můžeme bioptovat materiál pomocí dvakrát ohnuté jehly o dno misky nebo pomocí laseru. Doktorka Kokkali prezentovala výsledky svých zkušeností s biopsií blastocyst a optimalizací metody a potvrdila, že biopsie blastocysty neovlivňuje implantační potenciál embrya. Implantation rate blastocysty

byla 34% oproti 17% v kontrolní skupině, která neměla bioptované blastocysty. Hodnota klinického těhotenství na cyklus byla 55%, což je srovnatelné s kontrolní skupinou 50%. Tyto výsledky jasně demonstrují, že biopsie blastocysty nemá na vývoj embrya a jeho implantaci negativní vliv [Kokkali et al., 2007].

Pro genetickou analýzu jsou nejčastěji používány dvě metody: fluorescenční in situ hybridizace (FISH), která slouží k cytogenetické analýze chromozómů a polymerázová řetězová reakce (PCR), používaná k analýze monogenních onemocnění. V poslední době nabývá stále více na významu pro obě tyto oblasti metoda microarray.

FISH je molekulárně genetická technika založená na použití DNA sekvence, jenž je specifická pro vyšetřovaný chromozóm. Tzv. sonda hybridizuje s denaturovanou DNA (jak v metafázním stavu, tak ve stavu interfázním). V jádře pak odpovídá počet signálů ze sond počtu přítomných vyšetřovaných chromozómů.

FISH je nejčastěji používanou metodou analýzy chromozomálního složení blastomery [Wilton, 2002]. Odebrané buňky jsou zafixovány na mikroskopické sklo a poté je na ně aplikována DNA sonda, značená fluorochromem, která je specifická pro vyšetřovaný chromozóm. Typ a počet sond závisí na indikaci.

Prvotní použití FISH spočívalo v detekci pohlavních chromozómů embryí, kde bylo riziko přenosu různých X - vázaných genetických onemocnění, jako je hemofilie [Verlinski et al., 1996]. Současná aplikace zahrnuje především diagnostiku chromozomálních abnormalit a preimplantační genetický screening včetně detekce translokací.

Jestliže je nosičkou translokace žena, můžeme odebrat první polární tělísko, které je do 2 hodin po odběru oocytů z vaječníků ve stádiu metafáze. Pro Robertsonské translokace jsou používány tři DNA sondy na každý translokovaný chromosom - jedna „lokus-specifická“, položená proximálně od bodu zlomu, a dvě telomerické sondy, situované distálně od bodu zlomu. Pro reciproké translokace jsou používány minimálně tři sondy, jsou-li ale dostupné čtyři - dvě proximální a dvě distální, pak je analýza přesnější. Každá ze sond použitých společně v jednom hybridizačním kole musí být značena jiným fluorochromem, aby bylo možno odlišit počet vyšetřovaných chromozómů [Conn et al., 1998; Coonen et al., 2000; Van Assche et al., 1999].

Spolehlivost diagnózy při screeningu aneuploidií metodou FISH je 90 %. 10 % zahrnuje technické problémy, jako je selhání hybridizace, překryv signálů, artefakty, rozpadlé nebo difuzní signály a popsany mozaicismus [Wilton et al., 2002; Munné et al., 1998, Munné et al., 2003; Ruangvutilert et al., 2000].

Screening aneuploidií je limitován počtem DNA sond, které můžeme použít současně, jelikož je zde riziko selhání FISH s jejich zvyšujícím se počtem [Ruangvutilert et al., 2000] a též počtem hybridizačních kol. Bylo prokázáno, že hodnota FISH artefaktů je zhruba 5% z celkového počtu vyšetřovaných jader. Jednou z možností jak snížit riziko nesprávné diagnózy je odběr dvou blastomer, avšak zde je riziko snížení vývojového potenciálu embrya a snížení jeho schopnosti implantovat se do dělohy. Řešení problému by mohlo spočívat spíše ve zvolení správného počtu a typu testovaných chromozomů za současného použití subtelomerických sond k rehybridizaci v případě neinformativních výsledků [Munné et al., 2007a], což nám umožní zvýšit spolehlivost a přesnost metody, aniž bychom snížili životaschopnost a implantační potenciál vyšetřovaného embrya.

Pomocí PCR reakce je amplifikována sekvence DNA, jenž je ohraničena použitými specifickými primery. Toto umožňuje analýzu specifické sekvence DNA nebo amplifikaci vazebných polymorfních markerů (př. mikrosatelitů, SNPs, STRs) [Boyle et al., 2004]. Výchozí množství DNA z jedné buňky je znásobeno 10^5 až 10^6 krát.

Z důvodu vysoké citlivosti je problémem těchto analýz možnost kontaminace. Dalším rizikem je možnost preferenční amplifikace jedné ze dvou vyšetřovaných alel, jenž může vést k nesprávné diagnóze a transferu poškozeného embrya [Lissens et al., 1997]. K překonání tohoto problému byly vyvinuty nové techniky analýzy PCR fragmentů, jako je fluorescenční PCR a analýza fragmentů na automatickém sekvenátoru, které nám umožňují zjistit přesnou délku analyzovaného fragmentu, multiplex PCR [Sermon, 2002, Hussey et al., 2002], minisekvenování, nested PCR a real-time PCR [Syvänen, 1999; Fiorentino et al., 2003; Szuhai et al., 2001; Pierce et al., 2000; Rice et al., 2002].

Komparativní genomová hybridizace (CGH) v kombinaci s PGD je relativně nová, ale rychle se etablující technika [Voullaire et al., 2000; Wells a Delhanty, 2000;

Wilton et al. 2001; Wells et al. 2002, 2003]. Preamplifikovaná DNA embrya je označena flourochromem, například červeným, jenž je smíchán s preamplifikovanou kontrolní DNA označenou zeleným flourochromem, s nímž je porovnáván. Směs je aplikována na kontrolní metafázní jádra a je měřen vzájemný poměr barev. Oblast, kde převažuje červená barva, ukazuje, že zde převládá červeně značený vyšetřovaný genetický materiál a naopak oblasti, kde převládá zelená barva, ukazují, že je zde málo vyšetřovaného genetického materiálu. Výhodou CGH je možnost analyzovat celý genom, nevýhodou neschopnost detekovat balancované translokace a polyploidie. Další nevýhodou je, že celá procedura trvá 72 hodin, což značně limituje její použití v PGD/PGS. Cílem výzkumu jsou technická zlepšení vedoucí ke zkrácení času potřebného k analýze a k vylepšení rozlišení složení genomu díky použití microarray čipů - microarray CGH [Wells, 2007a; Wells a Delhanty, 2000; Wilton et al., 2001].

Microarraye jsou nástroje genetické analýzy, jež nám umožňují testování tisíce diskretních míst v lidském genomu nebo transkriptomu současně. Jedná se o kombinaci celogenomové amplifikace (WGA) a microarray technologie. V závislosti na použité metodologii mohou být microarraye použity k testování mutací, stanovení genové exprese nebo detekci chromozomální imbalance a aneuploidie. Tyto oblasti aplikace mají velký význam pro PGD monogenních onemocnění, stanovení viability embrya, respektive k preimplantačnímu genetickému screeningu aneuploidií

Počet vyšetřovaných chromozomů se na jednotlivých pracovištích liší, obvykle je vyšetřováno 5 až 9 párů chromozomů. Data z poslední doby ukazují, že pro tuto indikaci k PGS je nejpřínosnější analýza osmi chromozómů (X, Y, 13, 15, 16, 18, 21, 22), která prokazatelně zvyšuje hodnoty implantation rate [Munné et al. 2002a, 2007a].

Přínosem PGS by mělo být zvýšení pregnancy rate (PR), snížení počtu spontánních potratů a lepší hodnoty implantation rate (IR) na jedno transferované embryo. Ačkoliv řada retrospektivních studií tyto naděje potvrzuje, skutečný přínos musí být vyhodnocen v kontrolované randomizované studii [Mastenbroek et al., 2007].

Mozaicismus a jeho vliv na PGD/PGS

U PGS však bohužel existuje riziko falešně pozitivní či falešně negativní diagnózy díky vysokým hodnotám mozaicismu v rýhujících se embryích. Toto riziko závisí na věku matky, metodě analýzy (FISH, CGH) a počtu analyzovaných chromozómů [Munné et al., 1998; Ruangvutilert et al., 2000; Bielanska et al., 2002; Staessen et al., 2004]. Z dosavadních studií vyplývá, že mozaicismus může zahrnovat všechny chromozómy [Wilton et al., 2001, 2007]. Díky tomuto jevu analýza jedné buňky nemusí vypovídat o chromozomální konstituci ve zbytku embrya. Proto někteří autoři doporučují analyzovat z každého embrya raději dvě blastomery než jednu [Baart et al., 2006], což však může mít dopad na vývojový potenciál embrya a tím pádem zůstává zatím nepotvrzeno, že tento postup má pozitivní vliv na úspěšnost léčby neplodnosti.

Díky jevu mozaicismu nikdy nebude PGS osmibuněčného embrya plně spolehlivá, a to i když jsou bioptovány dvě blastomery, takže vyvstává otázka, zda je nutné riskovat snížení viability embrya, i když víme, že analýza dvou buněk kvůli mozaicismu není 100% přesná.

Vývojový potenciál mozaického embrya závisí na množství normálních buněk v embryu. Postzygotické chyby vedoucí k mozaicismu se mohou objevit a přetrvat v celém průběhu preimplantačního vývoje *in vitro*. Výsledky naznačují, že mozaicismus zahrnující složené chromozomální imbalance a/nebo imbalance postihující velkou část buněk v embryu, poškozují vývoj do stádia blastocysty [Bielanska et al., 2002]. Z výše uvedeného vyplývá, že ani další zdokonalování technik k detekci aneuploidií nemusí znamenat zlepšení péče o neplodné páry do doby, než lépe porozumíme podstatě a vlivu mozaicismu v embryu. Dokud nebude toto objasněno, PGS může vést k transferu abnormálních embryí nebo naopak k vyřazení kvalitních embryí.

Mozaicismus byl nalezen jak v plodové, tak v placentární tkáni v prvním i v druhém trimestru těhotenství, ale jeho incidence je velmi nízká. Je přítomný pouze u 5% aneuploidních spontánních potratů v 6. – 20. týdnu těhotenství a v 1 - 2% životaschopných těhotenstvích vyšetřených pomocí standardních metod prenatální diagnostiky, např. pomocí biopsie choriových klků [Bielanska et al., 2002].

V současné době se jeví jako pravděpodobné, že existují dva typy mozaicismu v preimplantačních embryích. Prvním je mozaicismus, jenž postihuje jednu buňku v šesti až osmibuněčném embryu, což je mozaicismus připomínající ten, jenž je přítomný v choriových klících a v buňkách plodové vody ($2n/2n + 1$ nebo $2n/2n - 1$). Jestliže pouze jedna buňka v osmibuněčném embryu nese abnormalitu, nemusí toto nezbytně vést k zhoubnému ovlivnění životaschopnosti embrya. Embryo může jednoduše vykazovat pouze očekávané chyby patřící k buněčnému dělení či jednobuněčná aneuploidie může značit buňku v apoptóze. Čím více bude použito DNA sond k FISH analýze, tím více bude diagnostikováno abnormálních buněk, což může vést k mylnému označení embrya jako patologického [Gianaroli et al., 2002a, 2002b; Staessen et al., 2004]. Jestliže je tato úvaha správná, význam jedné aneuploidní buňky může být méně biologický než diagnostický, což ovšem přináší řadu nových otázek do PGS - zda je lepší odběr jedné nebo dvou buněk, kolik má být analyzováno chromozómů, kdy je optimální čas pro odběr biologického materiálu a jaká analytická metoda je nejvhodnější.

Druhý typ mozaicismu je tzv. chaotický mozaicismus a jeho vliv bývá pro embryo letální. U takto postižených preimplantačních embryí je téměř každá buňka abnormální. Na rozdíl od mozaicismu nalézaném při prenatalní genetické diagnóze ($2n/2n + 1$ nebo $2n/2n - 1$), zahrnuje tento typ abnormality více chromozómů. Chaotický mozaicismus může být výsledkem selhání kontrolních bodů buněčného cyklu.

Lze říci, že důsledek chromozomálního mozaicismu na vývoj lidského embrya zatím není zcela objasněn a tudíž detekce a vyřazování mozaických embryí může vést ke ztrátě potenciálně životaschopných normálních embryí [Staessen et al., 2004]. Nutnost dalšího výzkumu na tomto poli je tedy zřejmá.

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 diferenciací, uchovávají si normální karyotyp a mohou se diferencovat v buňky ektodermu, entodermu či mezodermu, a to jak *in vitro*, tak i *in vivo* po jejich vpravení do imunodeficientních myší ve vznikajících teratokarcinomových tumorech.

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 (partenogeneze je proces, kterým je oocyt stimulován k dělení a vyvíjí se v embryo bez fertilizace).

V současné době sílí tlak odvozovat tzv. „eticky čisté“ EKB, tedy takové, jejichž získání nevede ke zničení lidského embrya. Cest je několik – bylo prokázáno, že je možno získat linie odběrem jedné až dvou blastomer, buněčnou fúzí či indukováním dospělých kmenových buněk (DKB) pomocí 2 až 4 genů, vložených do jejich genomu.

Totipotentní EKB jsou schopny vytvářet tkáně a orgány, a to díky několika svým charakteristickým vlastnostem - po mnoho pokolení (měsíce až roky) se dobře dělí, jsou bez specializace a mohou být indukovány tak, aby se diferencovali v jakémkoliv směru, do jakýchkoliv specializovaných buněk. Kromě těchto známých vlastností byla v poslední době objevena jejich schopnost “reprogramovat” DKB *in vitro*, které poté vykazují charakteristiky pluripotentních buněk, tj. exprimují markery pluripotence (např. Oct-4, nanog či Rex-1), reaktivují inaktivní chromozóm X

ženských somatických buněk a objevuje se demethylace DNA [Do et Scholer, 2006; Ferrari et al., 1998; Orlic et al., 2001; Shen et al., 2003].

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].

Mezi buňky schopné dediferenciace patří např. hematopoetické buňky získávané z pupečnickové krve.

Smyslem našich experimentů bylo ko-kultivací těchto buněk s EKB objasnit možnosti a mechanismy jejich transdiferenciace, a to tak, aby je bylo možno lépe využít v buněčné terapii.

4 Souhrn vlastních výsledků

4.1 Studium interakcí embryonálních kmenových buněk a hematopoetických kmenových buněk

4.1.1 Materiál a metodika

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.

Purifikace HKB z pupečnickové krve

HKB jsou charakterizovány přítomností markeru CD34 [Baum et al., 1992; Osawa et al., 1996; Pflumio et al., 1996]. Jejich selekce byla provedena imunomagneticky pomocí isolačního kitu (Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Midi-MACS System, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) [Gabbianelli et al., 1990; Thoma et al., 1994].

Detekce CD34+ buněk průtokovou cytometrií

Průtoková cytometrie byla prováděna na systému FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) a analyzována pomocí softwaru CELLQuestPro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Z každého vzorku pupečnickové krve bylo získáno přibližně 3×10^4 buněk. Mrtvé buňky a debris byly analýzou vyřazeny. Kontrola homogenity CD34+ buněčné populace byla prováděna pomocí následujících protilátek: CD133/2-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD34-PerCP-CY5.5 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) a CD45-FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Pouze ty vzorky, které obsahovaly více než 90 % CD34+ buněk byly použity pro další experimenty.

K detekci dediferenciace byly použity následující markery pluripotence: SSEA-4 (Chemicon, Temecula, CA), Tra-1-60 (Chemicon, Temecula, CA) a Tra-1-81 (Chemicon, Temecula, CA). K vizualizaci markerů jsme použili anti-myší biotin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) a streptavidin-APC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Kokultivační systém

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.

Experiment č. 2: Myší EKB byly pěstovány bez podpůrných buněk. Stav jejich diferenciací 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.

V obou experimentech bylo použito TX-WES médium (ThrombX, Leuven, Belgie) doplněné 10 % fetálním telecím sérem (FTS) a 2mol/L L-Glutaminem.

Imunocytochemie

Kontrola diferenciací myších EKB byla prováděna imunohistochemicky – buňky byly zkoumány na přítomnost alkalické fosfatázy (AP) (Alkaline Phosphatase Substrat Kit III, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), cytokeratinu (EPOSTM Anti-human Cytokeratin/HRP; DakoCytomation, Glostrup, Dánsko) a vimentinu (EPOSTM Anti-Vimentin/HRP; DakoCytomation, Glostrup, Dánsko). Myší EKB byly fixovány 1 % paraformaldehydem. Detekce AP byla prováděna dle firemního protokolu. Po té byla prováděna detekce cytokeratinu a vimentinu. Fixované buňky byly inkubované s cytokeratinem/HRP (1:10) a vimentinem/HRP (1:10). Po inkubaci byly buňky opláchnuty a byl použit běžný DAB systém (peroxidase substrate diaminobenzidine).

4.1.2 Souhrn výsledků a jejich diskuze

V experimentu č. 1 byla prováděna kokultivace mEKB + MIMF a HKB. 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.

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 k 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. Příkladem je nemožnost použití myšího LIF v systému. Ačkoliv by LIF zachoval dediferenciaci myších EKB, pro lidské HKB je zcela nevhodný. Podobně je tomu s použitým médiem, TX-WES, které je optimální pro mEKB, ale není nejlepší volbou pro HKB. Z toho tedy jasně vyplývá, že největší šanci na úspěch dediferenciace budou mít kokultivační systémy založené na komponentech pocházejících z jednoho živočišného druhu.

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]. První linie mEKB byla popsána v roce 1981 [Evans et al., 1981; Martin et al., 1981] a trvalo dalších téměř 20 let, než se podařilo publikovat derivaci první linie lidských EKB [Thomson et al., 1998]. Od té doby se tyto dva světy neustále setkávají, lidské EKB byly v minulosti v mnoha publikacích pěstovány na podpůrných buňkách myšího původu apod. Takové uspořádání je však nepoužitelné

pro humánní medicínu [Korytová et al., 1999; Mikkola et al., 2006]. Aby bylo možné lidské EKB použít, je nutno je pěstovat co možná nejbezpečněji. Z toho důvodu jsou podpůrné buňky zvířecího původu postupně nahrazovány lidskými buňkami, např. fibroblasty [Inzunza et al., 2005] anebo vypuštěny úplně [Klimanskaya et al., 2005]. Dalším důležitým krokem je úprava médií, a to tak, aby obsahovala pouze proteiny lidského původu či ještě lépe syntetické, přesně definované růstové faktory. Mechanicky (ne enzymaticky) prováděná izolace embryoblastu i pasážování kolonií je dalším krokem k zvýšení bezpečného používání linií [Skottman et al., 2006].

K objevu média, jež bude "čisté", složené jen ze syntetických růstových faktorů přesně definovaných koncentrací, přispívá studium různých regulačních molekul. Jedním z cytokinů, který reguluje pluripotenci a spontánní diferenciaci EKB a jehož mechanismy působení (ačkoliv je o nich již sepsáno na stovky prací) ještě nejsou zcela pochopeny, je LIF.

Zatímco u mEKB je funkce LIF zřejmá - jeho přítomnost v médiu zachovává linii v nediferencovaném stavu a aktivace STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3) skrze receptor pro LIF (LIF-R) se zdá dostačující pro zachování pluripotence, u lidských EKB je situace daleko složitější. Bylo prokázáno, že LIF-R beta a gp130 (další součást LIF-R) jsou exprimované na lidských EKB a také, že LIF může indukovat fosforylaci STAT 3. I přesto LIF sám o sobě není schopen pluripotenci lidských EKB udržet [Daheron et al., 2004]. Expres LIF i LIF-R (jak mRNA, tak proteinu) byla prokázána na spontánně se diferencujících lidských EKB. Tato exprese je signifikantně větší než u nediferencovaných buněk, které hojně exprimují SOCS - 1 (supresor cytokinové signalizace - 1). Ani suplementace LIFu do média nezastavila spontánní diferenciaci buněk [Aghajanova et al., 2006].

Navíc LIF reguluje expresi celé řady dalších významných molekul, např. CD 44 a lamininu A, které hrají významnou roli v diferenciaci lidských EKB [Choi et al., 2006; Wright et al., 2003; Xiao et al., 2006].

Další studium trans- a dediferenciace přispěje k rozvoji buněčné terapie.

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

4.2.1 Materiál a metodika

Od roku 2007 do února 2011 bylo v Institutu reprodukční medicíny v Plzni provedeno u 470 pacientek preimplantační genetické vyšetření z různých indikací. Toto vyšetření je prováděno pomocí dvou metod. Jednak metodou FISH, která umožňuje vyloučit přítomnost aneuploidie a translokace u chromozómů, jednak metodou PCR, která slouží k vyloučení monogenetických onemocnění.

FISH procedura byla nejprve provedena ve dvou kolech: první pro chromozómy 13, 18, 21, X a Y (MultiVysion PGT Probe panel; Abbott Laboratories, Downers Grove, IL, USA) a druhé pro chromozómy 16 a 22 (Abbott Laboratories, Downers Grove, IL, USA). Hybridizační roztok pro druhé kolo hybridizace jsme připravili smícháním sondy pro chromozóm 16 (Abbott Laboratories, Satellite II DNA/D16Z3 probe, Spectrum Orange) a sondy pro chromozóm 22 (Abbott Laboratories, LSI 22, 22q11.2, Spectrum Green). FISH procedura byla prováděna dle protokolu výrobce. V případě nejasného výsledku bylo provedeno ještě třetí kolo hybridizace k objasnění této nejasnosti. V tomto případě byla volena nová sonda, vázající se na jiné místo sledovaného chromozomu. Výsledky všech kol hybridizace byly analyzovány za pomoci mikroskopu Olympus BX51 s příslušnými filtry (Abbott Laboratories, Downers Grove, IL, USA) a zobrazovacím softwarem MetaSystems, Germany.

Metoda PCR byla provedena ve spolupráci s Reproduction Institute Chicago v USA, kam byly třetí kultivační den bioptované blastomery, po předchozím důkladném ověření možnosti stanovení diagnózy, zaslány expresním kurýrem (World courier).

Pro účely naší studie bylo z tohoto souboru vybráno 30 pacientek, u kterých bylo 3. den k dispozici více jak 7 embryí pro genetické vyšetření a také pro teoretický výběr embryí k elektivnímu embryotransferu. Preimplantační genetický screening aneuploidií u těchto pacientek byl proveden a to z těchto indikací:

- pokročilý věk matky (nad 37 let) nebo otce (nad 50 let),
- opakované selhání léčby,
- infertilita nebo přání rodičů

Zastoupení jednotlivých skupin dokumentuje tabulka 4.2 - 1.

Ve vybraném souboru pacientek jsme nebrali ohled na způsob a délku stimulace. Ta byla provedena ve většině případů dlouhým stimulačním protokolem za použití analogu Decapeptyl k downregulaci a HMG preparátu Menopur ke stimulaci. Ovariální punkce s odběrem vajíček byla provedena standardně v celkové anestézii. Ve sledovaném kolektivu nebyl dále brán ohled ani na metodu fertilizace. Ta byla provedena jednak metodou ICSI nebo metodou IMSI, tak jak jsou popsány v publikacích našeho pracoviště [Zech et al., 2007] a v příloze č. 2 této práce. Kultivace byla u všech pacientek provedena v miskách Nunclan (Nunc, Denmark), v médiu Global (Life Global, IVFonline Corp., Guilford, CT 06437, USA). Každý den byla embrya monitorována a byl hodnocen jednak průběh a dále kvalita vývoje podle Gardnera [Gardner et Lane, 2003a]. Toto dokumentují přiložené tabulky 4.2 - 2 a 4.2 - 3.

Po vyřazení embryí neschopných dalšího vývoje byla 3. den, po krátkodobé kultivaci v bioptickém médiu (Life Global, Ontario, Canada), provedena biopsie jedné blastomery pro preimplantační genetickou diagnostiku. Otevření zony pellucidy bylo provedeno mechanickým hatchingem skleněnou pipetou (Microtech, Brno, ČR). Genetické vyšetření bylo provedeno metodou FISH ve dvou až třech hybridizacích. 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]. Riziko mozaicismu, které je u buněčných embryí 20 - 90%, klesá s následným embryonálním vývojem do stádia blastocysty na cca 10% [Cohen et al., 2007]. Vzhledem k interindividuálním rozdílům v jeho procentuálním zastoupení a nemožnosti jeho kvantifikace u embryí použitých k transferu nebo kryokonzervaci, ho nelze v této studii zohlednit.

V den 5 byly po klasifikaci dle Gardnera [Gardner et al., 2003a; Veeck et al., 1999] morfologicky nejlepší blastocysty, které zároveň nevykazovaly žádné patologie v genetické analýze, vybrány pro embryotrasfer. Příklady blastocyst transferovaných v den 5 znázorňuje tabulka 4.2 - 4. Transferována byla standardně jen 2 embrya a ve dvou případech 3.

4.2.2 Souhrn výsledků a jejich diskuze

3. den kultivace byla vybrána teoreticky možná embrya pro transfer. Kritériem výběru byla morfologická kvalita v ranních hodinách třetího dne. Vybrána byla buď všechna TOP embrya – tedy embrya kvalifikace 8A1, 8B1 nebo 7B1 (dokumentuje tabulka 4.2 – 5), a nebo pokud embrya této kvality nebyla přítomna, byla vybrána 3 morfologicky nejlepší embrya, která by při nemožnosti další kultivace a selekce byla v třetí den transferována. Počty vybraných embryí shrnuje tabulka 4.2 – 6.

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. Tyto počty shrnuje opět tabulka 4.2 – 6.

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. Zajímavé zjištění bylo u dvou pacientek, u kterých byla transferována 2 geneticky vhodná embrya, ale vůbec se neshodující s embryi, která by byla vybraná pro embryotransfer v den 3 podle morfologických kritérií. Obě tyto pacientky otěhotněly a porodily zdravé dítě. Ve 3 případech nebyla k dispozici žádná embrya pro embryotransfer, přestože v den 3 byla k dispozici TOP nebo jiná, ale k transferu vhodná embrya.

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. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.2 - 6.

Tato čísla jsou vysoká a potvrzují známou skutečnost vyšší pravděpodobnosti otěhotnění při vyšším počtu získaných vajíček. Účelově byl vybrán takový soubor, aby bylo možno na větším počtu embryí výsledky porovnat.

Je možno se ale domnívat, že i v takto vybraném souboru pacientek s dostatečným počtem získaných vajíček by bez další kultivace do stádia blastocyst těchto výsledků nikdy nebylo dosaženo a že je vhodné kombinovat tuto „výhodu“ s možností embrya dále selektovat.

V této studii jsme nezohlednili shodu mezi morfologickým výběrem v den 3 a v den 5 společně s výsledkem genetické analýzy transferovaných embryí, což je součástí právě probíhající rozsáhlejší studie.

4.2.3 Závěr

Studie potvrdila nedokonalost a snad i nemožnost výběru vhodných energeticky zdatných a geneticky zdravých embryí podle morfologických kritérií v den 3. Podle morfologických kritérií u embryí vybraných třetí den, se více jak polovina případů neshodovala se zdravými embryi vybranými genetickou analýzou.

Potvrdili jsme, že kombinace kultivace do stádia blastocyst s genetickou analýzou a tím vyloučení geneticky patologických embryí pro transfer výrazně zvyšuje úspěšnost léčby v souboru pacientek s větším počtem získaných vajíček.

4.3 Přínos kultivace do stádia blastocyst pro zvýšení úspěšnosti léčení neplodnosti

4.3.1 Materiál a metodika

Pro pětidenní kultivaci oplodněného vajíčka do stádia blastocysty bylo použito medium Global (Life Global IVFonline Corp., Guilford, CT 06437, USA). Třetí den kultivace byla embrya přemístěna do čerstvého ekvilibrovaného média.

Vývoj embryí byl každý den zhodnocen a klasifikován dle Gardnera. [Gardner et al., 2003a; Veeck et al., 1999]. Vývojová stadia znázorňuje tabulka 4.2 – 3. Pátý den kultivace byla embrya ve stádiu blastocyst klasifikována dle Gardnera a morfologicky nejlepší byly vybrány pro embryotransfer. Přehled kvality blastocyst znázorňuje tabulka 4.3 – 1.

Literárních údaje a naše předcházející zkušenosti vedly k očekávání, že při embryotransferu vyselektovaných blastocyst v den 5 bude dosaženo vyšších hodnot implantace, což by mohlo vést k vícečetnému těhotenství, a proto jsme tedy v den 5 transferovali ve většině případů (67%) jen 2 embrya.

Transfer byl proveden transferovým katetrem (Wallace, Ontario, USA) po předchozím vyšetření a sondáži dělohy a ve většině případů za ultrazvukové kontroly.

Výjimečně jsme transferovali 3 embrya (v 11%) a to jen u žen starších 38 let, u kterých je v literatuře popsána snížená možnost implantace a stoupající nebezpečí ukončení vývoje krátce po implantaci [Berryman et al., 2003]. Více než 3 embrya jsme netransferovali nikdy.

4.3.2 Souhrn výsledků a jejich diskuze

V roce 2009 bylo v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie v Plzni provedeno 460 stimulovaných cyklů. V 52 cyklech nebylo dosaženo fertilizace nebo se embrya dále nevyvíjela a ve 408 cyklech jsme mohli provést embryotransfer. Výsledky léčby, kdy došlo k úspěšnému embryotransferu, který byl v našem centru proveden vždy v den 5, jsou shrnuty v tabulce 4.3 - 2.

Naše výsledky PR/ET jsme porovnali s hodnotami udávanými v IVF registru Spolkové republiky Německo (Deutsches IVF Register 2009), kam mají všechna

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 dokumentuje tabulka 4.3 - 3, v níž zcela zřetelně vidíme 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.

Těchto přesvědčivě lepších výsledků bylo dosaženo transferováním menšího počtu embryí, což dokládá tabulka 4.3 - 4. V Německu byla transferována 3 embrya v 22%, v našem souboru jen u 11% a v 19% jsme naopak transferovali jen jedno embryo.

Naše výsledky potvrdily očekávání a shodují se s literárními údaji. Na základě platnosti "Embryonenschutzgesetz" tedy zákona na ochranu embryí nemohou německá centra kultivovat více embryí, než může být transferováno. Transferovat je doporučeno maximálně 3 embrya. Proto déle než jeden den (do dosažení syngamie) mohou být v Německu kultivována jen 3 oplodněná vajíčka. Vzhledem k nepřipravenosti endometria v den 1 po odběru vajíček, je kultivace často prodloužena do dne 2 nebo 3. Údaje publikované v DIR (Deutsches IVF Register) vycházejí tedy v naprosté většině z cyklů, u kterých byl embryotransfer proveden v den 2 nebo 3. Ojediněle kultivují některá centra do dne 5, ale mohou to být opět jen ta 3 embrya vybraná v den 1, takže selekce je vyloučena. Tyto ojedinělé cykly jsou nevýznamné pro zdůraznění výhod selekce v prodloužené kultivaci do stádia blastocyst, a tudíž jsme je mohli v těchto velkých číslech zanedbat a statistiku z tohoto registru použít pro naše srovnání.

Ve srovnání s údaji v DIR dosáhl soubor našich pacientů (tabulka 4.3 - 2) vyšší úspěšnosti v PR po ET. Zcela přesvědčivý byl rozdíl ve skupině pacientek nad 35 let a ještě větší ve skupině nad 40 let. V této věkové skupině bychom mohli o nutnosti kultivovat embrya do blastocyst a možnosti selekce hovořit jako o „*conditio sine qua non*“. Potvrzuje se totiž, že se stoupajícím věkem klesá počet kvalitních a geneticky zdravých vajíček a tím vzrůstá důležitost selekce embryí. Ve skupině pacientek do 35 let a dále ještě více ve skupině do 29 let je tento rozdíl v PR

po ET menší, což dokazuje naše zkušenosti a údaje z řady publikací, že tedy podíl geneticky zdravých a energeticky dobře vybavených vajíček je u mladších matek vyšší [Obradors et al., 2011]. Dalším nezanedbatelným faktem přispívajícím k lepším výsledkům, je dokonalejší připravenost endometria a jeho synchronizace [Zech et al., 2002].

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 v 11% ze všech embryotransferů jsme zavedli 3 embrya vzhledem k 22% v souboru DIR.

4.3.3 Závěr

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

4.4.1 Materiál a metodika

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.

Studovaná embrya

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. Průměrný počet bioptovaných embryí na 1 cyklus byl 15 a průměrný věk ženy byl 39 let. Všechny páry podepsaly informovaný souhlas s provedením PGS.

Stimulace, odběr oocytů a ICSI byly provedeny standardně a jsou popsány v publikacích z našeho pracoviště [Zech et al., 2007].

Biopsie embrya

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%.

Procedura byla zahájena krátkou inkubací (méně než 3 minuty) v roztoku bez Ca^{2+} a Mg^{2+} (LifeGlobal, Ontario, Canada).

Mechanickým hatchingem byl vytvořen otvor v zona pelucida (ZP) a následně byla vyňata jedna blastomera s jádrem. Fixace byla provedena roztokem methanolu a kyseliny octové (3:1) [Velilla et al., 2002]. Po biopsii byla embrya dále kultivována individuálně v non-sekvenčním médiu Global (LifeGlobal, Ontario, Canada) při 37°C a atmosféře s 6% CO_2 .

Validace sond

Každá sonda a každá směs sond byla před použitím testována - byla zkoumána její účinnost při hybridizaci na buňkách v interfázi (alespoň 200 buněk) a metafázi (alespoň 50 buněk). Specifická a sensitivita v metafázi musela dosahovat 100%, aby byla sonda dále používána. Pro FISH v interfázi byla hranicí 95% úspěšnost ve vizualizaci správného počtu hybridizačních signálů. Pokud byla úspěšnost nižší než 95%, modifikovali jsme protokol tak, aby byla vyřazena příčina selhání protokolu (např. výskyt signálu z pozadí byl řešen zvýšením odmyvací teploty apod.). V případě neúspěchu našich modifikací jsme kontaktovali výrobce a testovali jinou sondu (tzn. sondu jiného LOT označení).

FISH

FISH procedura byla nejprve provedena ve dvou kolech: první pro chromozomy 13, 18, 21, X a Y (MultiVysion PGT Probe panel; Abbott Laboratories, Downers Grove, IL, USA) a druhé pro chromozomy 16 a 22 (Abbott Laboratories, Downers Grove, IL, USA). Hybridizační roztok pro druhé kolo hybridizace jsme připravili smícháním sondy pro chromozóm 16 (Abbott Laboratories, Satellite II DNA/D16Z3 probe, Spectrum Orange) a sondy pro chromozóm 22 (Abbott Laboratories, LSI 22, 22q11.2, Spectrum Green). FISH procedura byla prováděna dle instrukcí výrobce.

V případě, že některý z výsledků byl nereprezentativní (tzn. nejednoznačný, nejasný, non-informativní), prováděli jsme třetí kolo hybridizace, zameřené pouze na chromozóm, jehož výsledek byl neprůkazný. Sondy používané pro toto třetí, re-hybridizační kolo byly subtelomerické, s vazbou na nějaký lokus na p či q raménku testovaného chromozómu a vybrané vždy tak, aby se vážali na jiné místo než před tím použité sondy.

Pokud nereprezentativní výsledek vyžadoval kombinaci sond od různých výrobců, ověřovali jsme vždy účinnost směsi na normálních lymfocytech z periferní krve a úspěšnost musela dosahovat alespoň 95%, abychom směs dále používali. Výsledky prvních dvou kol hybridizace byly analyzovány za pomoci mikroskopu Olympus BX51 s příslušnými filtry (Abbott Laboratories, Downers Grove, IL, USA) a zobrazovacím softwarem MetaSystems, Germany.

Hodnotící kritéria a statistické analýzy

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.

Nejčastějším důvodem k provedení re-hybridizace byla monosomie a složená aneuploidie, která zahrnuje dvojité monosomie, monosomie spojené s nullisomií či samostatná nullisomie (daný chromozóm nevysílá žádný signál).

Statistické analýzy byly prováděny za pomoci Wilcoxonova a dvojitého Fischerova testu.

4.4.2 Souhrn výsledků a jejich diskuze

Celkem jsme analyzovali 702 blastomer ze 719 embryí, pocházejících z 95 IVF cyklů. Blastomery ze 17 embryí nebyly analyzovány, protože byly bezjaderné. 15 z těchto embryí se ve vývoji zcela zastavilo – buď v den 3 či den 4 a nebylo tedy možno je použít pro transfer. Zbývající 2 embrya se vyvíjela dále, ale ani ony nebyla pro transfer využita.

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

Tyto nejasné výsledky bylo možno rozdělit do 4 kategorií:

1. suspektní monosomie – byla nalezena u 46,4% blastomer s nejasným výsledkem – z nich bylo

- 85% monosomií
- 10,5% překrývající se signály
- 4,5% polymorfismy

2. suspektní trisomie – 40,2% blastomer s nejasným výsledkem – z nich bylo

- 33,3% difusních signálů
- 26,3% nespecifická hybridizace s vysokou aktivitou pozadí
- 19,3% rozdělené signály
- 12,3% cross-hybridizace

- 8,8% polymorfismy

3. složená aneuploide – 8,5% blastomer s nejasným výsledkem – z nich

- monosomie a nullisomie – 58,3%

- nullisomie – 41,7%

4. jádra bez výsledku na daný chromozóm – 4,9 %

- týkalo se většinou chromozómu 18 a příčinou byl chromatin nízké kvality.

Tyto nejasné výsledky byly analyzovány pomocí třetího kola hybridizace a tímto způsobem bylo objasněno 95,8% případů ($P < 0,001$). Euploidie byla nalezena u 42,6% suspektních monosomií, u 82,4% suspektních trisomií, u 16,7% složených aneuploidií a u 71,4% případů původně bez výsledku pro daný chromozóm. Pouze 4,2% nerepresentativních výsledků nebylo možno vysvětlit – jednalo se o 4,6% suspektních monosomií, 3,5% suspektních trisomií a 8,3% složených aneuploidií. Přehledné výsledky jsou vidět na obrázku 4.4 – 1.

Chromozómem, který byl nejčastěji příčinou nutnosti re-hybridizace, byl chromozóm 18 – podílel se celkem na 24,5% všech nerepresentativních výsledků. Druhým nejčastějším byl chromozóm 13 (21,2% výsledků). Chromozómy 16, 22 a 21 měly téměř stejnou frekvenci nerepresentativních výsledků (17,6%; 16,7%; 16,3%) a chromozómy X a Y byly zastoupeny nejméně (3,7% nerepresentativních výsledků). Důležitým faktorem analýzy byla vždy kvalita a fixace chromatinu.

Při validaci sond jsme potvrdili dříve publikované výsledky – u lymfocytů s jádry v interfázi je spolehlivost metody vždy menší než 100%, v metafázi je specifická a senzitivita hybridizace 100%, bez známek cross-hybridizace [Weremowicz et al., 2006]. Tato studie také potvrdila výskyt běžných polymorfismů a odchylek ve velikosti repetitivních úseků, což opět potvrdilo význam současného testování vzorků DNA od obou rodičů. Pouze tak můžeme předejít chybné diagnóze při interpretaci větších či menších signálů, které bývají příčinou falešně negativních či falešně pozitivních nálezů, např. pro chromozómy 13/21 a 18/16 [Weremowicz et al. 2001; Iwarsson et al., 2000]. Obecně platí, že směsi dvou sond dosahují spolehlivosti 72% až 96%. Při použití jedné sondy bychom měli dosahovat 90 až 95% úspěšnosti.

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. Výsledky dokumentují obrázky 4.4 – 2 a 4.4 – 3.

PGD/PGS je analýza jedné jediné buňky a jak již bylo zmíněno výše, FISH je metodika ovlivnitelná mnoha faktory, jež sami o sobě mohou vést k suboptimální kvalitě posuzovaných jader. Taková jádra by měla být analyzována a nikoliv vyloučena z hodnocení. Naše výsledky prokázaly, že nízká kvalita jader je spojena se selháním hybridizace zvláště u chromozómu 18 (při použití panelů PGT a PB) a chromozómu 16 (při použití panelu PB). Sonda pro chromozóm 13 (označená Texaskou červení) měla největší intenzitu pozadí a nespecifickou hybridizaci.

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 nereprezentativních výsledků provádíme výše popsanou 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.

Zcela zvláštní a důležitou otázkou zůstává počet chromozómů, jež by měl být testován. Jak ukazují výsledky validací sond, s jejich rostoucím počtem a se zvyšováním počtu kol FISH analýzy, spolehlivost hybridizace klesá [Weremowicz et al., 2006] doporučuje testování pouze těch chromozómů, které jsou nejčastěji příčinou spontánních potratů. Domníváme se, že též chromozómy zapojené v selhávání implantace by neměly být opomíjeny.

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 studiemi.

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 Literatura

Alizadeh, Z., Kageyama, S., Aoki, F. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 2005, roč. 72, č. 3, s. 281-290.

Alikani, M., Cohen, J., Tomkin, G., Garrisi, G.J., Mack, C., Scott, R.T. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*, 1999, roč. 71, roč. 5, s. 836-42.

Aghajanova L, Skottman H, Strömberg AM, Inzunza J, Lahesmaa R, Hovatta O. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptors is increased during differentiation of human embryonic stem cells. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4 Suppl):1193-209. Epub 2006 Sep 1.

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.

Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 1;89(7):2804-8.

Berryman J, Thorpe K, Windridge K. *Older Mothers; Conception, Pregnancy and Birth After 35*, Pandora, 1995, ISBN 0-04-440906-0.

Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod*. 1998 Dec;13(12):3406-13.

- 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.
- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Feb 27;215(1-2):135-41.
- Boué A, Boué J, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet.* 1985;14:1-57.
- Boyle KE, Vlahos N, Jarow JP. Assisted reproductive technology in the new millennium: part II. *Urology.* 2004 Feb;63(2):217-24.
- Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 1988, roč. 332, č. 6163, s. 459-61.
- 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.
- Brigham SA, Conlon C, Farquharson RG. A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 1999 Nov;14(11):2868-71.
- Bunting KD, Hawley RG. Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells. *Biol Cell.* 2003 Dec;95(9):563-78.
- Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod.* 2003 Jul;18(7):1371-6.
- Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2001 Apr;75(4):678-82.
- Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril.* 2007 Mar;87(3):496-503. Epub 2006 Dec 4.
- 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.
- Conn CM, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Genet.* 1998 Jan;102(1):117-23.
- Coonen E, Martini E, Dumoulin JC, Hollanders-Crombach HT, de Die-Smulders C, Geraedts JP, Hopman AH, Evers JL. Preimplantation genetic diagnosis of a

- reciprocal translocation t(3;11)(q27.3;q24.3) in siblings. *Mol Hum Reprod.* 2000 Mar;6(3):199-206.
- Cram D. (2007) Blastocyst biopsy for developmental competence. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.* 1994 Dec 2;266(5190):1508-18.
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 2;93(7):3115-20.
- 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.
- Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(5):770-8.
- 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.
- Desai N, Filipovits J, Goldfarb J. Secretion of soluble HLA-G by day 3 human embryos associated with higher pregnancy and implantation rates: assay of culture media using a new ELISA kit. *Reprod Biomed Online.* 2006 Aug;13(2):272-7.
- Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update.* 2004 Jan-Feb;10(1):19-28.
- Do JT, Schöler HR. Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2006;(60):35-45.
- Dominguez F, Pellicer A, Simon C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface--a review. *Placenta.* 2003 Oct;24 Suppl B:S48-55.
- Dorfmann AD, Iwaszko MA, Geltinger ME, Sisson ME, Reeves M, Gara H. The effect of BIOPSY on human embryo progression from day 3 to day 5. *Fertil Steril.* 2007 Sept;88(3):88-88.

Emiliani S, Delbaere A, Vannin AS, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y, Devreker F. Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. *Hum Reprod.* 2003 Oct;18(10):2145-50.

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.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.

Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, Baldi M, Gianaroli L. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod.* 2003 Jul;9(7):399-410.

Fisch JD, Keskindepe L, Ginsburg M, Adamowicz M, Sher G. Graduated Embryo Score and soluble human leukocyte antigen-G expression improve assisted reproductive technology outcomes and suggest a basis for elective single-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2007 Apr;87(4):757-63. Epub 2007 Jan 16.

Gabbianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, Testa U, Isacchi G, Peschle C. "Pure" human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science.* 1990 Sep 28;249(4976):1561-4.

Galán A, O'Connor JE, Valbuena D, Herrero 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.

Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 2003a Jun;6(4):470-81.

Gardner D. K., Lane M., Kouridakis K., Schoolcraft W. B. (1997) Complex physiologically based serum-free culture media increase mammalian embryo development. In Gomel V, Leung PCK, eds. *In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction, Proceedings of the Tenth World Congress*, Munduzzi Editore, Bologna 187-91.

Geraedts JP, Harper J, Braude P, Sermon K, Veiga A, Gianaroli L, Agan N, Munné S, Gitlin S, Blenow E, de Boer K, Hussey N, Traeger-Synodinos J, Lee SH, Viville S, Krey L, Ray P, Emiliani S, Liu YH, Vermeulen S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD), a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centres. *Prenat Diagn*. 2001 Dec;21(12):1086-92.

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.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod*. 2002a Dec;17(12):3201-7.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online*. 2002b;4 Suppl 3:31-6.

Giorgetti C, Hans E, Terriou P, Salzmann J, Barry B, Chabert-Orsini V, Chinchole JM, Franquebalme JP, Glowaczower E, Sitri MC, Thibault MC, Roulier R. Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 2007 Jan;14(1):85-91.

Giudice LC. Genes associated with embryonic attachment and implantation and the role of progesterone. *J Reprod Med*. 1999 Feb;44(2 Suppl):165-71.

Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol.* 1998 Feb;39(2):137-43.

Handyside AH, Ogilvie CM. Screening oocytes and preimplantation embryos for aneuploidy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999 Jun;11(3):301-5.

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.

Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet.* 1989 Feb 18;1(8634):347-9.

Hansis C, Grifo JA, Tang Y, Krey LC. Assessment of beta-HCG, beta-LH mRNA and ploidy in individual human blastomeres. *Reprod Biomed Online.* 2002 Sep-Oct;5(2):156-61.

Hansis C, Tang YX, Grifo JA, Krey LC. Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Mol Hum Reprod.* 2001 Feb;7(2):155-61.

Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod.* 1990 Aug;5(6):708-14.

Hassold T, Benham F, Leppert M. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet.* 1988 Apr;42(4):534-41.

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.

Herrler A, von Rango U, Beier HM. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online.* 2003 Mar;6(2):244-56.

Huges M. (2007) Microarrays for PGD of single gene and chromosome disorders. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis Internationally Society Conference, Melbourne

Hussey ND, Davis T, Hall JR, Barry MF, Draper R, Norman RJ, Rudzki Z. Preimplantation genetic diagnosis for beta-thalassaemia using sequencing of single cell PCR products to detect mutations and polymorphic loci. *Mol Hum Reprod.* 2002 Dec;8(12):1136-43.

Chaouat G, Ledee-bataill N, Dubanchet S. Is there a place for immunomodulation in assisted reproduction techniques? *J Reprod Immunol*. 2004 Jun;62(1-2):29-39.

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol*. 2002 Jan;53(1-2):241-56.

Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil*. 1994 Jul;101(2):421-6.

Choi CH, Roh CR, Kim TJ, Choi YL, Lee JW, Kim BG, Lee JH, Bae DS. Expression of CD44 adhesion molecules on human placentae. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006 Sep-Oct;128(1-2):243-7. Epub 2006 Feb 2.

Inzunza J, Gertow K, Strömberg MA, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, Wolbank S, Ahrlund-Richter L, Hovatta O. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*. 2005 Apr;23(4):544-9.

Iwarsson E, Malmgren H, Inzunza J, Ahrlund-Richter L, Sjöblom P, Rosenlund B, Fridström M, Hovatta O, Nordenskjöld M, Blennow E. Highly abnormal cleavage divisions in preimplantation embryos from translocation carriers. *Prenat Diagn*. 2000 Dec;20(13):1038-47.

Jacobs PA, Hassold TJ, Whittington E, Butler G, Collyer S, Keston M, Lee M. Klinefelter's syndrome: an analysis of the origin of the additional sex chromosome using molecular probes. *Ann Hum Genet*. 1988 May;52(Pt 2):93-109.

Jansen R. (2007) Mitochondrial contribution to embryo development from fertilisation to gastrulation. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne

Jones G. M. (2007) Gene expression and oocyte developmental competence. 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.

Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril*. 1998 Sep;70(3):397-411.

Juriscova A, Antenos M, Varmuza S, Tilly JL, Casper RF. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for

the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod.* 2003 Mar;9(3):133-41.

Kahraman S. (2007) Embryo development and chromosomal abnormalities. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne

Kapiteijn K, Koolwijk P, van der Weiden RM, van Nieuw Amerongen G, Plaisier M, van Hinsbergh VW, Helmerhorst FM. Human embryo-conditioned medium stimulates in vitro endometrial angiogenesis. *Fertil Steril.* 2006 Apr;85 Suppl 1:1232-9.

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.

Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod.* 1996 Jul;11(7):1492-8.

Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West MD, Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet.* 2005 May 7-13;365(9471):1636-41.

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.

Kokkali G. (2007) Blastocyst biopsy and outcomes. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne

Koryntová D, Jelínková L, Rezábek K, Zivný J. Assisted reproduction--present status and perspectives. *Ceska Gynekol.* 1999 Nov;64(6):383-8.

Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simón C. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S2-9.

Kuliev A., Kuznetsova I., Cieslak J. et al. (2007) Aneuploidy in human oogenesis. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne

Ledée-Bataille N. Secreted cytokines in the uterine lumina are predictive of subsequent implantation. Presence of IL18 in the uterine flushing. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2004 Feb;33(1 Pt 2):S29-32.

Lissens W, Sermon K. Preimplantation genetic diagnosis: current status and new developments. *Hum Reprod.* 1997 Aug;12(8):1756-61.

- 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.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril.* 2007 Mar;87(3):534-41. Epub 2006 Nov 21.
- Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod.* 2000 Aug;15(8):1781-6.
- 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.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med.* 2007 Jul 5;357(1):9-17. Epub 2007 Jul 4.
- 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.
- May KM, Jacobs PA, Lee M, Ratcliffe S, Robinson A, Nielsen J, Hassold TJ. The parental origin of the extra X chromosome in 47,XXX females. *Am J Hum Genet.* 1990 Apr;46(4):754-61.
- 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.
- Mikkola M, Olsson C, Palgi J, Ustinov J, Palomaki T, Horelli-Kuitunen N, Knuutila S, Lundin K, Otonkoski T, Tuuri T. Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. *BMC Dev Biol.* 2006 Aug 8;6:40.

Mikołajczyk M, Skrzypczak J, Szymanowski K, Wirstlein P. The assessment of LIF in uterine flushing--a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol.* 2003 Nov;3(3):259-70.

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, Tomkin G, Cohen J. Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations. *Fertil Steril.* 2009 Mar;91(3):943-5. Epub 2007 Oct 10.

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.* 2002 May-Jun;4(3):223-32.

Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online*. 2002a Mar-Apr;4(2):183-96.

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.

Munné S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod*. 1994 Sep;51(3):373-9.

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.

Noyes N, Fino ME, Krey L, McCaffrey C, Adler A, Grifo J. Embryo biopsy: the fate of abnormal pronuclear embryos. *Reprod Biomed Online*. 2008 Dec;17(6):782-8.

Nyboe Andersen A, Gianaroli L, Nygren KG; European IVF-monitoring programme; European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2004 Mar;19(3):490-503. Epub 2004 Jan 29.

Obradors A, Rius M, Daina G, Ramos L, Benet J, Navarro J. Whole-chromosome aneuploidy analysis in human oocytes: focus on comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res*. 2011;133(2-4):119-26. Epub 2011 Apr 7.

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.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701-5.

Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):242-5.

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1999 May;14(5):1266-73.

Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med.* 2006 Mar 16;354(11):1139-46.

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.

Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, Remohí J, Simón C. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 1999 Jun;71(6):1033-9.

Pellestor F, Girardet A, Andréo B, Arnal F, Humeau C. Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev.* 1994 Oct;39(2):141-6.

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.

Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2001 Oct-Nov;52(1-2):35-43.

Pierce KE, Rice JE, Sanchez JA, Brenner C, Wangh LJ. Real-time PCR using molecular beacons for accurate detection of the Y chromosome in single human blastomeres. *Mol Hum Reprod.* 2000 Dec;6(12):1155-64.

Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood.* 1996 Nov 15;88(10):3731-40.

Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukharenko V, Kuliev A, Verlinsky Y. Accuracy of preimplantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1999 Apr;16(4):192-8.

Rice JE, Sanchez JA, Pierce KE, Wangh LJ. Real-time PCR with molecular beacons provides a highly accurate assay for detection of Tay-Sachs alleles in single cells. *Prenat Diagn.* 2002 Dec;22(12):1130-4.

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.

Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH, Harper JC. FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn*. 2000 Jul;20(7):552-60.

Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol*. 2001 Oct-Nov;52(1-2):15-33.

Saito S. Cytokine network at the fetomaternal interface. *J Reprod Immunol*. 2000 Jul;47(2):87-103.

Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*. 1999 Oct;72(4):604-9.

Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S, De Die C. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod*. 2005 Jan;20(1):19-34. Epub 2004 Nov 18.

Sermon K., Van Steirteghem A.: Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 2004;363:1633-41.

Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update*. 2002 Jan-Feb;8(1):11-20.

Shen CN, Horb ME, Slack JM, Tosh D. Transdifferentiation of pancreas to liver. *Mech Dev*. 2003 Jan;120(1):107-16.

Shamblott 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.

- Stern JJ, Dorfmann AD, Gutiérrez-Najar AJ, Cerrillo M, Coulam CB. Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 1996 Feb;65(2):250-3.
- 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.
- Szuhai K, Ouweland J, Dirks R, Lemaître M, Truffert J, Janssen G, Tanke H, Holme E, Maassen J, Raap A. Simultaneous A8344G heteroplasmy and mitochondrial DNA copy number quantification in myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome by a multiplex molecular beacon based real-time fluorescence PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 Feb 1;29(3):E13.
- Syvänen AC. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat*. 1999;13(1):1-10.
- Tabiasco J, Perrier d'Hauterive S, Thonon F, Parinaud J, Léandri R, Foidart JM, Chaouat G, Munaut C, Lombroso R, Selva J, Bergère M, Hammoud I, Kozma N, Aguerre-Girr M, Swales AK, Sargent IL, Le Bouteiller P, Lédée N. Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study. *Reprod Biomed Online*. 2009 Mar;18(3):374-81.
- Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update*. 1998 Sep-Oct;4(5):465-71.
- Tarín JJ, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH. Human embryo biopsy on the 2nd day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of a quarter of embryo retards cleavage. *Fertil Steril*. 1992 Nov;58(5):970-6.
- Thoma SJ, Lamping CP, Ziegler BL. Phenotype analysis of hematopoietic CD34+ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood*. 1994 Apr 15;83(8):2103-14.
- 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.

Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Lo HY. Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases. *J Assist Reprod Genet.* 2000 Sep;17(8):415-8.

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.

Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod.* 1999 Jul;5(7):682-90.

van Montfoort AP, Fiddelers AA, Janssen JM, Derhaag JG, Dirksen CD, Dunselman GA, Land JA, Geraedts JP, Evers JL, Dumoulin JC. In unselected patients, elective single embryo transfer prevents all multiples, but results in significantly lower pregnancy rates compared with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2006 Feb;21(2):338-43. Epub 2005 Oct 27.

Van Opstal D, Los FJ, Ramlakhan S, Van Hemel JO, Van Den Ouweland AM, Brandenburg H, Pieters MH, Verhoeff A, Vermeer MC, Dhont M, In't Veld PA. Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997 Apr;12(4):682-6.

Veeck LL. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology.* The Partheon Publishing Group, 1999, ISBN 18-507-0016-8.

Velilla E, Escudero T, Munné S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online.* 2002 May-Jun;4(3):210-7.

Verlinsky Y., Kuliev A. (2005) *Atlas of preimplantation genetic diagnosis*, second edition, Taylor and Francis, UK

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, Cieslak J, Evsikov S, Galat V, Kuliev A. Nuclear transfer for full karyotyping and preimplantation diagnosis for translocations. *Reprod Biomed Online*. 2002 Nov-Dec;5(3):300-5.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Freidine M, Cieslak J, Strom C, Lifchez A. Birth of a healthy girl after preimplantation gender determination using a combination of polymerase chain reaction and fluorescent in situ hybridization analysis. *Preimplantation Genetics Group. Fertil Steril*. 1996 Feb;65(2):358-60.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn*. 1992 Feb;12(2):103-10.

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.

Vinatier D, Tiffet O, Dufour P, Tiberghien B, Maunoury-Lefebvre C, Monnier JC. Cytokines and pregnancy: physiology. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1992;21(5):535-43.

Vogiagis D, Salamonsen LA. Review: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol*. 1999 Feb;160(2):181-90.

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.

Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. 2000 Feb;106(2):210-7.

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

Wells D, Levy B. Cytogenetics in reproductive medicine: the contribution of comparative genomic hybridization (CGH). *Bioessays*. 2003 Mar;25(3):289-300.

Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munné S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril*. 2002 Sep;78(3):543-9.

- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*. 2000 Nov;6(11):1055-62.
- Weremowicz S, Sandstrom DJ, Morton CC, Miron PM. Validation of DNA probes for preimplantation genetic diagnosis (PGD) by fluorescence in situ hybridization (FISH) R1. *Prenat Diagn*. 2006 Nov;26(11):1042-50.
- Weremowicz S, Sandstrom DJ, Morton CC, Niedzwiecki CA, Sandstrom MM, Bieber FR. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. *Prenat Diagn*. 2001 Apr;21(4):262-9.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1988 Jul 28;319(4):189-94.
- Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R. Integration of blastocyst transfer for all patients. *Fertil Steril*. 2002 Apr;77(4):693-6.
- Wilton L. (2007) Chromosomal status of early human embryos. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis Internationally Society Conference, Melbourne
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update*. 2005 Jan-Feb;11(1):33-41. Epub 2004 Nov 29.
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn*. 2002 Jun;22(6):512-8.
- 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.
- Wright LS, Li J, Caldwell MA, Wallace K, Johnson JA, Svendsen CN. Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem*. 2003 Jul;86(1):179-95.
- 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.
- Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006 Jun;24(6):1476-86. Epub 2006 Feb 2.
- 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.

Zech NH, Lejeune B, Puissant F, Vanderzwalmen S, Zech H, Vanderzwalmen P. Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. Fertil Steril. 2007 Jul;88(1):244-6. Epub 2007 Feb 8.

Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, Nyboe Andersen A, Selleskog U, Nielsen D, Grøndahl C, Kim H, Arce JC; CEMAS II and Study Group. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. Hum Reprod. 2003 Dec;18(12):2575-81.

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 Declaration of Human Genetic Data 2003
- International Bioethics Committee(IBC): Report on PGD and Germ-Line Intervention 2003
- Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights 1997

COE- Council of Europe, www.coe.int

ASRM- American Society for Reproductive Medicine, www.asrm.org

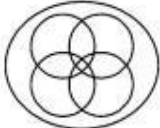
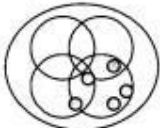
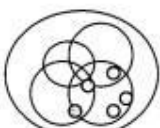
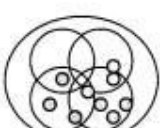
Ethikrat. (Němcký národní ethický výbor) www.ethikrat.org Polar body analysis 2004

7 Tabulky, schémata, obrázky

Tabulka 4.2 – 1 – Zastoupení jednotlivých skupin při indikaci k PGD

Zastoupení jednotlivých skupin při indikaci k PGD			
Pořadové číslo	Věk matky	Věk otce	Indikace
1	29	34	aborty, mutace A1298C homozygot
2	33	32	přání rodičů
3	37	41	věk matky
4	38	47	věk rodičů
5	39	39	věk matky
6	35	36	přání rodičů
7	31	40	přání rodičů
8	31	32	opakované selhání léčby
9	32	36	opakované aborty
10	39	38	věk matky
11	37	37	47XXX, 46XX, mozaika s disom.linií
12	37	41	věk a přání rodičů
13	42	47	výrazná teratozoospermie
14	39	42	věk matky
15	36	35	Oligoasthenozoospermie III.
16	42	37	věk matky
17	37	45	opakované aborty s trisomií 16 a 21
18	39	39	OAT III, chemotherapie u otce
19	37	39	přání rodičů
20	32	37	opakované aborty
21	34	55	opakované selhání implantace
22	42	37	věk matky
23	50	41	věk matky
24	30	30	OAT III.
25	36	36	přání rodičů
26	39	42	teratozoospermie
27	37	42	teratozoospermie
28	33	33	přání rodičů
29	41	42	věk matky
30	41	40	věk matky

Tabulka 4.2 – 2 - Schématické znázornění klasifikace dle Gardnera [Gardner et Lane, 2003a]

KLASIFIKACE EMBRYÍ DLE GARDNERA			
První číslo		Počet blastomer	
Druhé písmeno		Velikost blastomer	
Třetí číslo		% fragmentace	
Počet blastomer	Velikost blastomer	%fragmentace	Závěr
 4	rovnocenné <i>A</i>	0 % <i>1</i>	<i>4 A 1</i>
 4	rovnocenné <i>A</i>	<20 % <i>2</i>	<i>4 A 2</i>
 4	nerovnocenné <i>B</i>	<20 % <i>2</i>	<i>4 B 2</i>
 4	rovnocenné <i>A</i>	20 % -50% <i>3</i>	<i>4 A 3</i>
4 buněčné embryo	rovnocenné	> 50%	<i>4 A 4</i>
4 buněčné embryo	nerovnocenné	> 50%	<i>4 B 4</i>
8 buněčné embryo	rovnocenné	0%	<i>8 A 1</i>

Tabulka 4.2 – 3 - Příklady morfologie embryí dle klasifikace dle Gardnera [Gardner et Lane, 2003a]

Obrázky vybrány z vlastního obrazového materiálu IVF-Institut Plzeň © Uher 2011



4A1 Embryo – žádné granulace, všechny blastomery jsou stejně velké



4A2 Embryo – asi 10% objemu embrya granulace, všechny buňky jsou stejně velké



4A3 Embryo – kolem 20% objemu embrya granulací a buňky jsou nestejně velké



4B4 Embryo – kolem 50% objemu embrya granulací a buňky jsou nestejně velké

Tabulka 4.2 – 4 – Příklady blastocyst transferovaných v den 5

Vybráno z vlastního obrazového materiálu IVF-Institut Plzeň © Uher 2011



2 x hatchující blastocysta 5AB



hatchující blastocysta 5AB



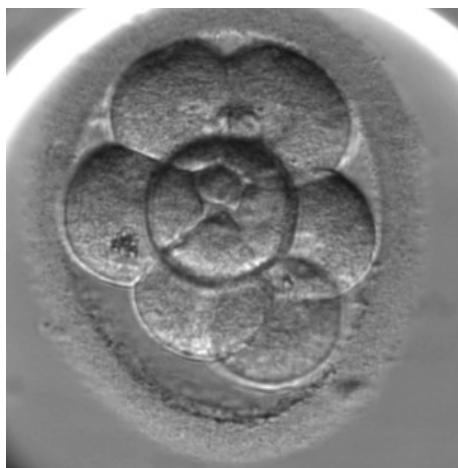
hatchující blastocysta 5AB



2x hatchující blastocysta 5BB

Tabulka 4.2 - 5 - Příklady TOP embryí transferovatelných v den 3

Vybráno z vlastního obrazového materiálu IVF-Institut Plzeň © Uher 2011



8A1



7B1







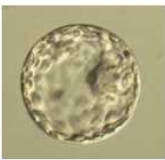


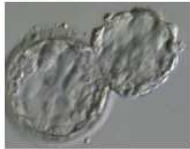
8A1

Tabulka 4.2 – 6 – Shoda mezi teoreticky vybranými embryi v den 3 a geneticky vhodnými v den 5

Shoda mezi teoreticky vybranými embryi v den 3 a geneticky vhodnými v den 5								
Číslo pacientky	Počet fertilizovaných vajíček	TOP embrya/ vybraná	Počet bioptovaných blastocyst	Geneticky normální	Počet shodných	%	ET	Výsledek
1	29	4	22	6	2	50	2	grav
2	10	5	9	6	3	60	2	poz
3	13	0	11	2	0	0	1	neg
4	13	4	11	2	0	0	2	neg
5	19	3	12	2	0	0	1	neg
6	16	5	14	5	1	20	2	neg
7	10	4	8	5	1	25	2	porod
8	18	10	18	5	2	20	2	grav
9	9	4	8	5	4	100	1	poz
10	12	2	11	3	0	0	2	poz
11	18	5	14	4	2	40	2	grav
12	9	1	7	1	0	0	0	bez ET
13	26	2	15	2	0	0	2	neg
14	17	3	9	6	2	66	2	poz
15	8	4	8	6	4	100	2	porod
16	15	4	11	1	0	0	1	neg
17	11	3	8	0	0	0	0	bez ET
18	19	3	11	1	0	0	0	bez ET
19	13	3	8	5	3	100	2	porod
20	15	3	12	5	0	0	2	grav
21	20	4	15	4	1	25	2	grav
22	16	4	16	5	2	50	3	neg
23	7	3	7	3	1	33	2	poz
24	14	4	10	3	1	25	2	neg
25	11	3	9	2	1	33	2	porod
26	8	4	8	3	2	50	2	neg
27	15	5	15	3	2	40	3	poz
28	15	5	10	7	4	80	2	neg
29	12	4	11	5	2	50	2	porod
30	8	3	7	2	2	66	2	porod

Tabulka 4.3 – 1 - Příklady morfologické klasifikace blastocyst v den 5

Obrázky vybrány z vlastního obrazového materiálu IVF-Institut Plzeň © Uher 2011

Vývojové stádium	Popis	Příklad	Příklad	Příklad
1	Časná blastocysta <i>První náznak dutinky</i>	 1 AA	 1AA	
2	Blastocysta <i>Dutinka zabírá více než 50% blastocysty</i>	 2 AA		
3	Blastocysta <i>Dutinka zabírá 90% objemu blastocysty</i>	 3 AA		
4	Expandovaná blastocysta <i>Buňky trofoektodermu jsou zploštělé a zona pellucida ztenčená</i>	 4 AA		
5	Hatchující blastocysta <i>Buňky trofoektodermu hatchují přes zonu pellucidu</i>	 5 AA	 5 AB	 5 BB
Klasifikace trofoektodermu a embryoblastu blastocysty	<i>Číslo</i> <i>První písmeno</i> <i>Druhé písmeno</i>	<i>vývojové stádium</i> <i>kvalita buněk embryoblastu</i> <i>kvalita buněk trofoektodermu</i>		1 - 5 A - C A - C
Embryoblast	Velké množství pevně spojených buněk A	Několik volně svázaných buněk B	Pouze několik buněk C	
Trofoektoderm	Velké množství pravidelně uspořádaných buněk A	Menší množství nepravidelných oploštělých B	Pouze několik buněk C	

Tabulka 4.3 – 2 – Srovnání našich výsledků a DIR v roce 2009

Srovnání našich výsledků a DIR v roce 2009		
	DIR	IVF Plzeň
Celkový počet cyklů IVF/ICSI	49602	460
Počet cyklů s ET	45623	408
PR/ET (%)	29,26	54,32

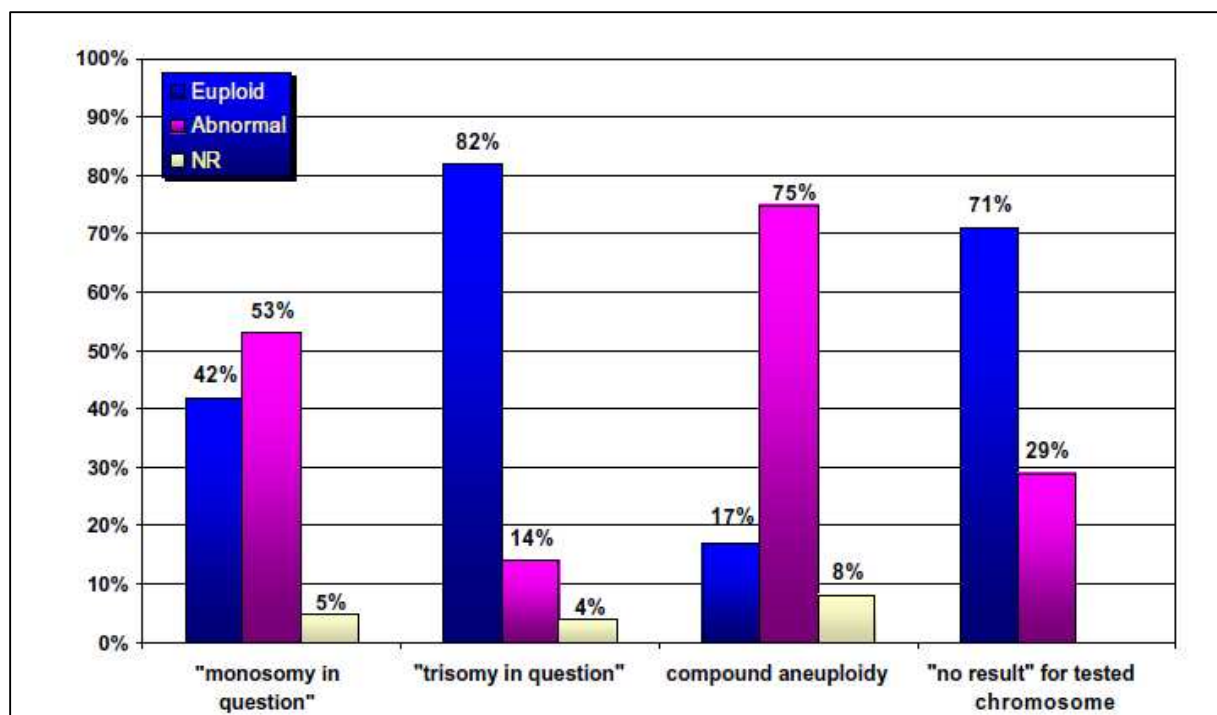
Tabulka 4.3 – 3 – Vliv věku ženy na úspěšnost ET

Vliv věku ženy na úspěšnost ET			
	DIR	IVF Plzeň	
Věk pacientky	Hodnota PR/ET (%)	Hodnota PR/ET	%
do 29 let	37,79	50 z 68	73,53
30 - 34 let	36,16	80 ze 132	60,61
35 - 39 let	27,35	73 ze 148	49,32
40 a více let	15,72	18 z 60	30
Celkem	29,26	221 ze 408	54,17

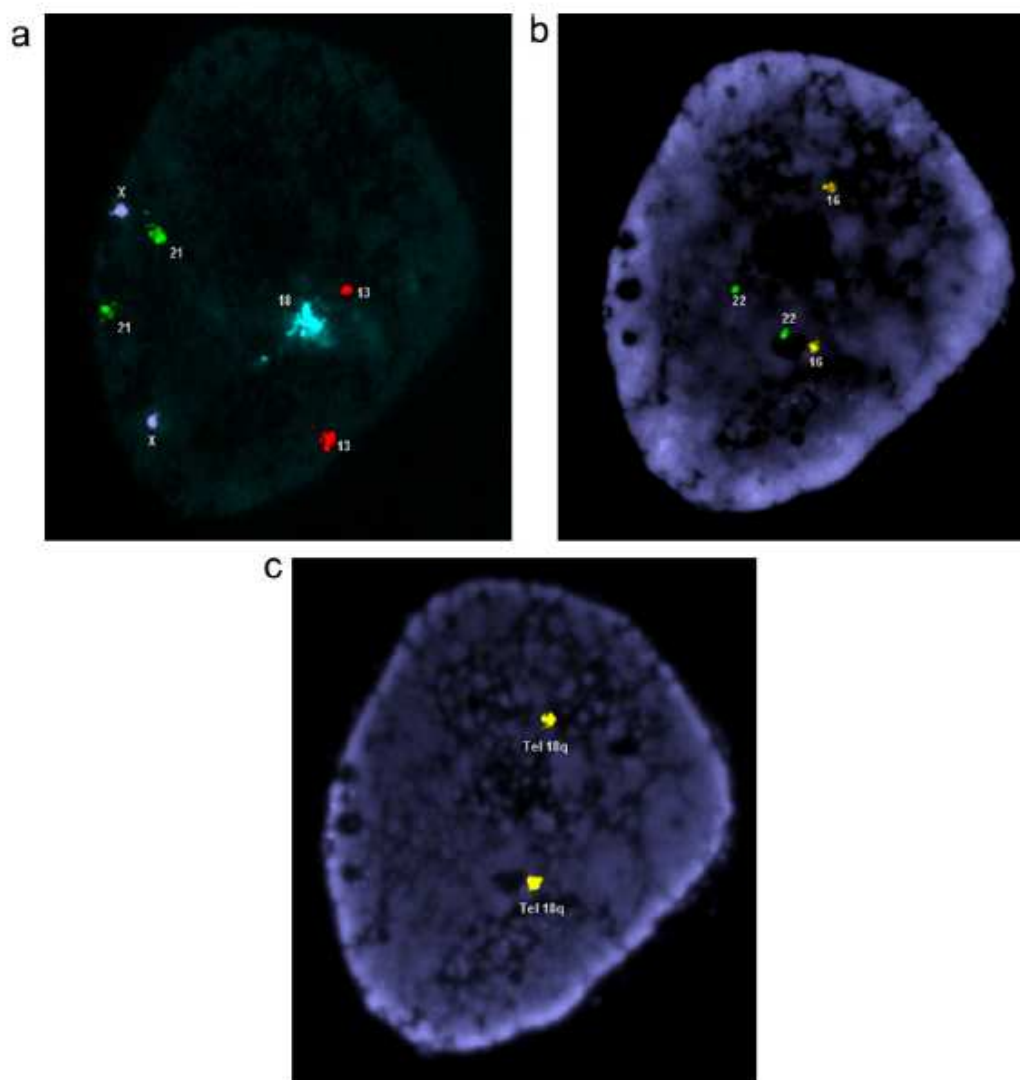
Tabulka 4.3 – 4 – Srovnání počtu transferovaných embryí

Srovnání počtu transferovaných embryí			
	DIR	IVF Plzeň	
	%	Počet	%
ET 3 embryí	22	45 ze 408	11,03
SET*		78 ze 408	19,12

* Single embryo transfer

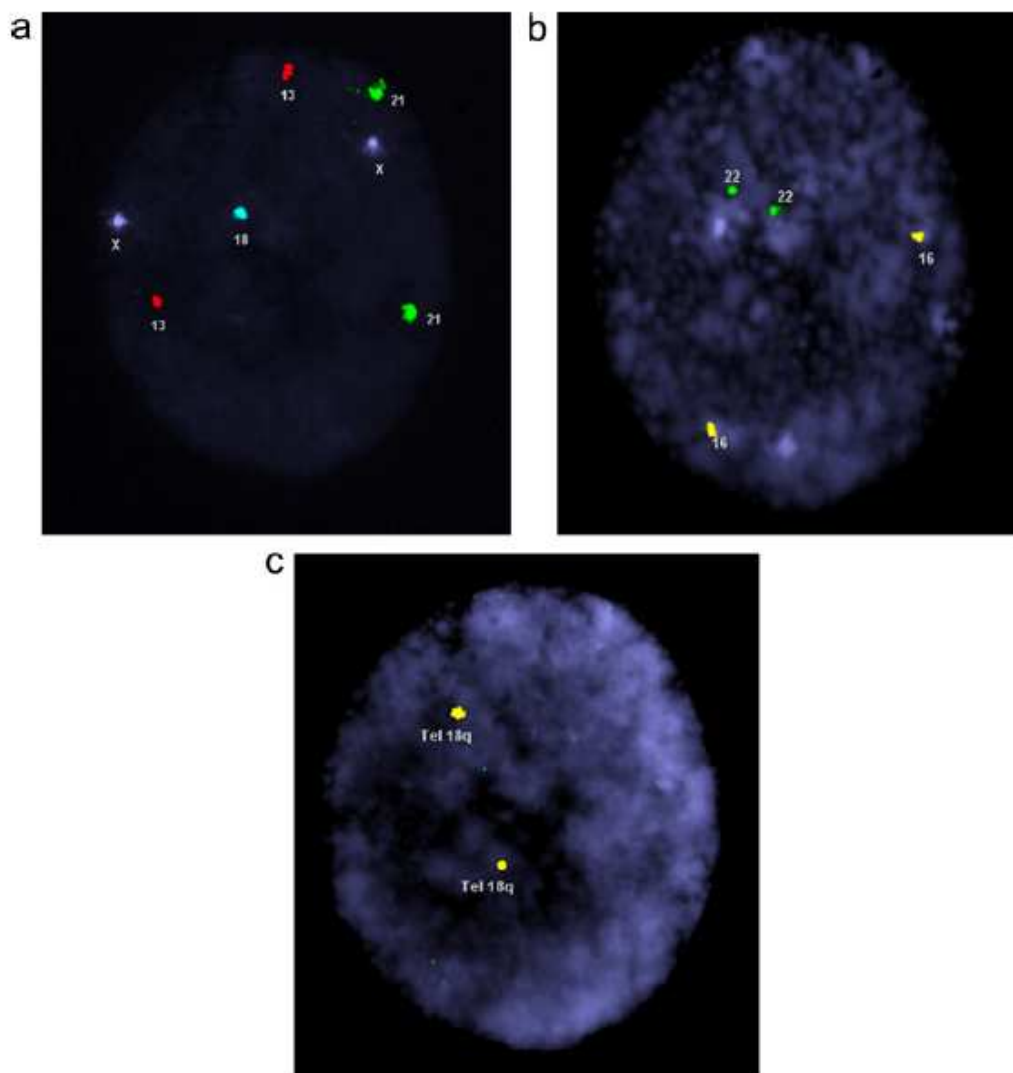


Obrázek 4.4 – 1 – Výsledky rehybridizace - „zachráněné“ výsledky, NR = bez výsledku



Obrázek 4.4 – 2 – Signály chromozomů I.

a) difúzní signál chromozómu 18 – MultiVysion PGT panel, b) druhé kole rehybridizace se sondami CEP 16 a LSI 22, c) rehybridizace stejného jádra chromozómu 18 se sub – telomerickou sondou Tel18q



Obrázek 4.4 – 3 – Signály chromozomů II.

a) monosomie 18 – MultiVysion PGT panel, b) druhé kolo re – hybridizace se sondami CEP 16 a LSI 22, c) re – hybridizace stejného jádra chromozómu 18 se sub – telomerickou sondou Tel18q

8 Přílohy

Příloha č. 1.

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

Příloha č. 2.

Vanderzwalmen, P., Hiemer, A., Rubner, P., Bach, M., Neyer, A., Stecher, A., **Uher, P.**, Zintz, M., Lejeune, B., Vanderzwalmen, S., Cassuto, G., Zech, N.H. 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

Příloha č. 3.

Uher, P., Baborová, P., Hüttelová, R., Králíčková, 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.

Příloha č. 4.

Uher, P., Hüttelová, R., Králíčková, M., Novotný, Z., Rokyta, Z., Vanderzwalmen, P. Jak dediferencovat hematopoetické kmenové buňky z umbilikální krve *in vitro*? Naše první výsledky s použitím kokultivačních systémů. *Ceska Gynekol*. 2007 Aug;72(4):280-3.

Příloha č. 5.

Králíčková, M., Šíma, R., Vaněček, T., Šíma, P., Rokyta, Z., Ulčová-Gallová, Z., Suchá, 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

Příloha č. 6.

Králíčková, M., Ulčová-Gallová, Z., Šíma, R., Vaněček, T., Šíma, P., Křížan, J., Suchá, R., **Uher, P.**, Hes, O., Novotný, Z., Rokyta, Z., Větvička, V. Association of the leukemia inhibitory factor gene mutation and the antiphospholipid antibodies in the peripheral blood of infertile women. *Folia Microbiol (Praha)*. 2007; 52(5): 543-8.
IF= 1,034, citováno 3x.

Příloha č. 1.

Uher P., Baborová P., Králíčková, M., Verlinsky Y., Zech NH.
Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a
third-round re-hybridization.

Reprod Biomed Online, 2009, Oct;19(4):539-46.

IF=3,21

Article

Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a third round of re-hybridization



Dr Petr Uher

Dr Petr Uher entered the field of human reproduction in 1985 as a member of Professor Ladislav Pilka's team, which reported the first child born via IVF in the Czech Republic and produced the first published description of gamete intrafallopian transfer (GIFT). Since 1990, Dr Uher has worked as one of the leading practitioners at the IVF Centers Prof. Zech, founding and leading two of the seven centers (Pilsen and Karlsbad). He also works on the development of preimplantation genetic diagnosis techniques and human stem cell research. He is author and co-author of many scientific publications.

Petr Uher^{1,5}, Petra Baborova^{1,2,5}, Milena Kralickova^{1,2}, Mathias H. Zech¹, Yury Verlinsky³, Nicolas H. Zech^{3,4,6}

¹IVF Centres Prof. Zech, Pilsen, Czech Republic; ²Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Prague, Czech Republic; ³Reproductive Genetics Institute, 2825 N Halsted Street, Chicago, USA; ⁴Department for Obstetrics and Gynecology, Unit of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University of Graz, Austria

⁵These authors contributed equally to this paper.

⁶Correspondence: e-mail: n.zech@ivf.at

Abstract

The incidence of non-informative results after fluorescence in-situ hybridization (FISH) was analysed in preimplantation genetic diagnosis (PGD). FISH was performed on seven chromosomes (13, 16, 18, 21, 22, X, and Y) in two rounds of hybridization (one biopsied blastomere per day 3 embryo). A third round with telomeric probes was performed in order to analyse the chromosome(s) in question. A total of 702 embryos out of a total of 719 embryos from 95 cycles were analysed. The remaining 17 embryos were anucleated and/or had poor quality and could not be diagnosed. After FISH analysis, 52.7% of blastomeres were found to be abnormal, 27.1% euploid, and 20.2% had non-informative results. Abnormalities considered as non-informative included 'monosomy in question' (46.5%), 'trisomy in question' (40.2%), compound aneuploidy (8.5%), and 'no result' (4.9%) for a tested chromosome. Following re-hybridization with telomeric probes, euploidy was found in 42.4% of 'monosomies in question,' in 82.4% of 'trisomies in question,' in 16.7% of compound aneuploidies, and in 71.4% of 'no results' for a tested chromosome. Only 4.2% of non-informative results could not be rescued. This study clearly demonstrates the importance of re-hybridizing non-informative results and monosomies using a third round of hybridization with telomeric probes for chromosome(s) in question.

Keywords: FISH, monosomy, non-informative result, PGD, re-hybridization, telomeric probes

Introduction

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is a method used to screen for certain genetic abnormalities in day 3 embryos after IVF. Fluorescence in-situ hybridization (FISH) is at present the only routine technique that allows for an analysis of the chromosome copy number in interphase and metaphase nuclei. In the case of aneuploidy screening, a blastomere is removed from day 3 embryos and hybridized with specific DNA probes using FISH. Usually, five to eight chromosomes are selected for hybridization with specific chromosome probes, which are mostly commercially avail-

able. This method enables the identification of any abnormal chromosomal constitution in embryos generated from IVF treatment, which was demonstrated to be relatively high (Macklon *et al.*, 2002; Wilton, 2002).

Although FISH analysis has greatly improved over the years, the problem of misdiagnosis remains high. Various exogenous and endogenous factors of the FISH technique may influence the analysis and lead to false-positive or false-negative results (Munné *et al.*, 1993, 1998; Wilton, 2002). The quality of the biological sample, the most important exogenous factor in PGD, is determined by embryo

characteristics. Poor-quality embryos have a higher probability of having degenerated interphase chromatin, apoptotic cells, and/or cytoplasmic inclusions, all of which may interfere with FISH signals. The target DNA distribution in the interphase nucleus is also important because it may cause overlapping, split or diffused signals.

Endogenous factors influencing FISH results include the fixation technique, the modification of FISH protocols, specificity and sensitivity of the probe or probe panel used for analysis, the combination of fluorochromes, and the number of chromosomes analysed (Abdelhadi *et al.*, 2003; Berend *et al.*, 2004; Weremowicz *et al.*, 2006; Baart *et al.*, 2007).

Fixation is crucial for a good analysis. Using a suboptimal method may lead to non-informative results. At present, the methanol/acetic acid method is recommended as it provides better results than fixation with Tween/HCl. A modification of the FISH protocol, such as changing the length of pepsin pretreatment, switching agents, or using different hybridization stringencies and wash conditions, also has important effects on the outcome of the analysis (PGDIS, 2008).

Both the sensitivity and specificity of the probe or probe panel depend on the type of probe (plasmid, cosmid, YAC, BAC), the type of labelling (PCR, nick translation), and the type and amount of DNA used for blocking repetitive sequences in the genome (Cot1, salmon, or placental DNA). Hence, it is essential to test each probe and every combination of probes for their sensitivity and specificity.

The PGD International Society (PGDIS) guidelines (2008) recommend testing at least eight chromosomes (13, 15, 16, 18, 21, 22, X, and Y). If FISH is performed on non-mosaic normal lymphocyte samples, the overall specificity and sensitivity of individual probes or mixtures is less than 100%, which is due to the above-mentioned exogenous and endogenous factors (Weremowicz *et al.*, 2006). There are still few data available on the hybridization efficiency of commercially available panels for PGD/preimplantation genetic screening (Anguiano *et al.*, 2003; Berend *et al.*, 2004). The efficiency ranges from 62% to 90% for five-probe PGT panels (Abbott Laboratories Inc., Downers Grove, IL, USA) to 90–95% for individual probes (Weremowicz *et al.*, 2006). The risk of an inaccurate result increases with the number of probes and FISH rounds (Henegariu *et al.*, 2001). This fact has to be countered with good laboratory practice in PGD.

Another problem is the interpretation of chromosome aneuploidies not commonly involved in either implantation failure or spontaneous abortions. It is difficult to interpret these aneuploidies correctly because of our incomplete knowledge of mosaicisms and their influence on the viability of embryos (Bielanska *et al.*, 2002), as well as incomplete understanding of cell cycle checkpoints (Ruangvutilert *et al.*, 2000; Coonen *et al.*, 2004; Chatzimeletiou *et al.*, 2005; Daphnis *et al.*, 2005).

Chaotic and trisomic results are seldom regarded as being false positive. A false-negative or 'no result' diagnosis for

the tested chromosome(s) may be attributed to technical artefacts, such as overlapping signals, loss of nuclear material during fixation or poor hybridization, as well as to true monosomy results or to mosaicism.

A third round of hybridization with telomeric probes for the chromosome(s) in question is recommended in order to increase the efficiency of PGD. This approach is called 'no result rescue,' and is recommended in the established guidelines for good PGD laboratory practice (Colls *et al.*, 2007; PGDIS, 2008).

Without the appropriate results, those embryos presenting with the chromosome(s) in question should, based also on the type of the non-informative result, be excluded from transfer. The numbers of normal embryos available for transfer is consequently lower.

The aim of this study was to analyse the incidence of non-informative results, to evaluate the efficiency of re-hybridization for non-informative results, and to demonstrate an improvement in normal results after performing a third round of analysis in selected groups of non-informative results.

Materials and methods

Embryos for PGD analysis

From January 2007 to December 2007, 88 patients underwent PGD for aneuploidy screening, resulting in 95 cycles with 719 embryos for biopsy and 702 for analysis. The average number of biopsied embryos per cycle was 15, and the mean age of the women was 39 years. All PGD cycles started after obtaining the patient's written consent. Stimulation, oocyte retrieval and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedures were performed as described elsewhere (Zech *et al.*, 2007).

Embryo biopsy

One blastomere was biopsied from each embryo demonstrating satisfactory development on day 3 (reaching at least the five-cell stage with $\leq 25\%$ of fragmentation). Initially, the embryos were de-compacted prior to biopsy through a short period of incubation (< 3 min) in Ca^{2+} and Mg^{2+} free medium (LifeGlobal, Ontario, Canada). Mechanical hatching was used to create an opening in the zona pellucida (ZP). The individually nucleated blastomere of the embryos was fixed in methanol/acetic acid (3:1) as described by Velilla *et al.* (2002). Following biopsy, the embryos were carefully washed and further cultured individually in non-sequential Global medium (LifeGlobal) at 37°C in a humidified atmosphere of $6\% \text{CO}_2$ in air.

Validation of probes and probe mixtures on interphase and metaphase cells

The efficiency of hybridization in interphase and metaphase cells was determined for every probe or probe mixture by testing parental lymphocytes prior to an analysis of the cells

themselves (Weremowicz *et al.*, 2001). The efficiency for interphase FISH assays with single- and double-colour DNA probes was considered satisfactory when at least 95% of the cells tested showed the correct number of hybridization signals. If the efficiency was <95%, the FISH protocol was modified until satisfactory results were obtained.

FISH

A two-round FISH procedure was performed: chromosomes 13, 18, 21, X, and Y (MultiVysion PGT Probe panel; Abbott Laboratories) were detected in the first round, and chromosomes 16 and 22 (Abbott Laboratories) were detected in the second. The hybridization solution for the second round of hybridization was prepared by mixing a probe for chromosome 16 (Abbott Laboratories, Satellite II DNA/D16Z3 probe, Spectrum Orange) and a probe for chromosome 22 (Abbott Laboratories, LSI 22, 22q11.2, Spectrum Green). The MultiVysion PGT Probe panel was used to validate probe efficiency in the first round, and a mixture of probes CEP 16 and LSI 22 was applied in the second round of hybridization. The efficiency of these probes was compared with the efficiency attained using the PB panel (MultiVysion PB Probe panel; Abbott Laboratories) in the first round of hybridization and CEP X/Y (CEP X SG/CEP Y (alpha) SO) in the second round of hybridization. The FISH procedure was performed according to the manufacturer's instructions. In order to ensure maximum efficiency, some modifications were applied to the hybridization times, the length of pepsin pre-treatment (which depended on the presence of cytoplasm), or to the post-washes after validation of the probes.

In the case of non-informative results, a third round of hybridization was performed on the chromosome(s) in question. In this case, telomeric probes were used, which bind to a different locus on the p- or q-arm/s for the tested chromosome/s. Probes were obtained from Abbott Laboratories: Telomere 13q SpectrumOrange, LSI 13 SpectrumGreen, Telomere 16q SpectrumOrange, Telomere 18p SpectrumGreen, Telomere 18q SpectrumOrange, Telomere 21q SpectrumOrange, Telomere 22q SpectrumOrange; CytoCell Technologies (UK): Telomere 13q SpectrumGreen, Telomere 13q SpectrumRed, Telomere 16q SpectrumGreen, Telomere 18q SpectrumGreen, Telomere 21q SpectrumGreen, Telomere 21q SpectrumRed, Telomere 22q SpectrumGreen; and Kreatech Biotechnology (The Netherlands): Telomere 13q SpectrumRed, Telomere 16q SpectrumGreen, Telomere 18q SpectrumGreen, Telomere 18q SpectrumRed, Telomere 21q SpectrumGreen, Telomere 21q SpectrumRed, Telomere 22q SpectrumGreen, Centomeric Y (DYZ3) SpectrumGreen.

The analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, slides were incubated in pepsin solution (0.5 mg/ml in 0.01 mol/l HCl) for 1 min at 37°C in a water bath, then washed in 1× PBS solution for 5 min at room temperature (RT), 3 min in 1% formaldehyde (1× PBS, 50 mmol/l MgCl₂) at RT, then in 1× PBS for 5 min at RT again and dehydrated in an ethanol series

(70%, 80%, 95%; every 2 min), air-dried and co-denatured with the probe(s) specific for the type of experiment. Depending on the type of probe(s) applied, specific programmes for co-denaturation as well as for wash conditions were used as described in the manufacturer's instructions.

If the pattern of non-informative results required the combination of probes from different manufacturers, the probe mixture was evaluated using normal lymphocytes from peripheral blood, and the conditions with the highest probe efficiency (no less than 95%) were used for subsequent analysis. The results of the first and second round were analysed by two observers using an Olympus BX51 fluorescence microscope equipped with the appropriate filter sets (Abbott Laboratories). The results were analysed after the images had been captured using the MetaSystems imaging system (Germany).

Scoring criteria and statistical analysis

Scoring criteria were applied according to Munné *et al.* (1998). The embryos were considered normal if two gonosomes and two of the chromosomes 13, 16, 18, 21, and 22 were present; haploid, triploid, or polyploid if one, three or more copies of the sets of tested chromosomes were present; chaotic if two or more abnormal results were found for two or more of the tested chromosomes; abnormal if the chromatin was fragmented and the signals were divided among these fragments; abnormal if after fixation of one blastomere that blastomere showed multinucleation.

Based on the results from the validation of probes and probe mixtures, monosomy was found to be a predominant feature of the failure of the hybridization technique. As a result, a third round of re-hybridization with telomeric probes was performed if monosomy was detected. Re-hybridization was also applied to compound aneuploidies, which involved double monosomy, monosomy together with nullisomy, and nullisomy ('no result' for the tested chromosome) alone.

All statistical analyses were performed using Fisher's exact test and Wilcoxon's test.

Results

Validation of probes and probe mixtures

Since the incorporation of PGD into the IVF programme, DNA probes and probe mixtures have been evaluated for all tests performed. The results of hybridization specificity and sensitivity in interphase and metaphase cells of parental lymphocytes confirmed better overall hybridization efficiency for a PGT panel with CEP 16/LSI 22 in the second round of hybridization (data not shown). This included the validation of probes for Robertsonian and reciprocal translocations and for aneuploidy screening as well as the validation of probe mixtures for the re-hybridization of non-informative results.

These tests also showed that the main signal failure in the PB panel was the result of monosomy and cross-hybridization for chromosomes 18 and 16, respectively (data not shown). The use of the PGT panel solved this problem.

Re-hybridization of non-informative results

A total of 702 blastomeres from 719 embryos produced in 95 IVF cycles were analysed for aneuploidy screening. Blastomeres of 17 embryos were anucleated and could therefore not be analysed. Fifteen of these embryos were arrested on day 3 or 4 of development and were not used for transfer. The remaining two of these embryos developed beyond the compacted stage; however, they were not considered for transfer either.

Following FISH analysis and prior to performing a third round of hybridization, 52.7% ($n = 370$) of blastomeres were abnormal, 27.1% ($n = 190$) had euploid results and 20.2% ($n = 142$) showed non-informative results.

Of the non-informative results, 66 (46.5%) were diagnosed with 'monosomy in question,' 57 (40.2%) with 'trisomy in question,' 12 (8.5%) with compound aneuploidy and seven (4.9%) with 'no result.'

Non-informative results were divided into four categories [category 1: 'monosomy in question' (this also includes overlapping signals and polymorphisms), category 2: 'trisomy in question,' category 3: compound aneuploidy, and category 4: 'no result' for a tested chromosome] (Table 1). In category 1, 84.8% (56/66) of 'monosomies in question' were considered to be monosomies, 10.6% (7/66) showed overlapping signals, and 4.5% (3/66) showed polymorphism. In the second category, 33.3% (19/57) of 'trisomies in question' had a diffused signal, 26.3% (15/57) were classified as non-specific hybridizations combined with background intensity, 19.3% (11/57)

showed split signals, 12.3% (7/57) were cross-hybridizations, and 8.8% (5/57) polymorphisms. In category 3, 58.3% (7/12) of the compound aneuploidies were classified as monosomy combined with nullisomy and 41.7% (5/12) were regarded as nullisomies. In category 4, 'no result' for a tested chromosome mainly included chromosome 18 (7/7). This was predominantly caused by poor chromatin quality.

Non-informative results were re-analysed by performing a third round of re-hybridization (Figure 1 and Table 2). This approach enabled clarification of 95.8% ($P < 0.001$) of such cases. After re-hybridization with telomeric probes, euploidy was found in 28/66 (42.4%) of 'monosomies in question,' in 47/57 (82.5%) of 'trisomies in question,' in 2/12 (16.7%) of compound aneuploidies, and in 5/7 (71.4%) of 'no results' for tested chromosomes. Only 4.2% (6 out of 142) of non-informative results could not be rescued, including 4.5% of 'monosomies in question' (3/66), 3.5% of 'trisomies in question' (2/57), and 8.3% of compound aneuploidies (1/12).

As shown in Table 3, chromosome 18 was the most commonly affected chromosome, accounting for 24.6% of all non-informative results. The nullisomies, monosomies, diffused, split or overlapping signals, and cross-hybridizations were the most frequent ones (Figures 2 and 3). The second most common chromosome involved was chromosome 13, which accounted for 21.2% of cases with diffused signals, non-specific hybridization, monosomies, etc. Chromosomes 16, 22, and 21 followed with almost the same frequency (17.6%; 16.9%; 16.2%), and chromosomes X and Y accounted for 3.5% of non-informative results. These results were related to the quality of fixation and chromatin quality.

When the results of monosomy re-hybridization were evaluated, the predominant chromosomes involved in

Table 1. Incidence of the various types of 'no result' ($n = 142$) in four different categories.

Category	Type of 'no result'	n (%)	Incidence (%)
'Monosomy in question'	Monosomy	56 (84.8)	66 (46.5)
	Overlapping signals	7 (10.6)	
	Polymorphisms ^a	3 (4.5)	
'Trisomy in question'	Diffused signals	19 (33.3)	57 (40.1)
	Non-specific hybridization ^b	15 (26.3)	
	Split signals	11 (19.3)	
	Cross-hybridization	7 (12.3)	
	Polymorphisms ^a	5 (8.8)	
Compound aneuploidy	Nullisomy and monosomy	7 (58.3)	12 (8.5)
	Double monosomy	5 (41.7)	
'No result' for tested chromosome	Nullisomy	7 (100)	7 (4.9)

^aPolymorphisms of chromosomes 1, 9, 16, and Y may lead to qh+ or qh- result.

^b'Signal' without clear indication as an artefact together with background intensity.

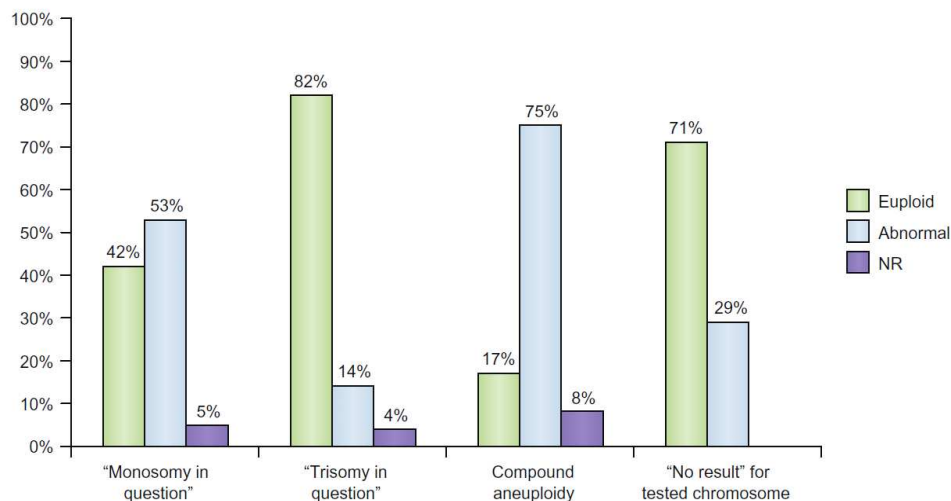


Figure 1. Percentages of 'rescued' results according to the categories analysed. NR, no result.

Table 2. Results of a third round of re-hybridization of previously non-informative results.

Non-informative result (n = 142)	Euploid	Not rescued
'Monosomy in question'	28/66 (42.4)	3/66 (4.6)
'Trisomy in question'	47/57 (82.4)	2/57 (3.5)
Compound aneuploidy	2/12 (16.7)	1/12 (8.3)
'No result' for tested chromosome	5/7 (71.4)	–

Values are n (%). Total rescued = 136/142 (95.8).

Table 3. Incidence of affected chromosomes and predominant chromosomes involved in monosomies.

Chromosome	Incidence of chromosomes affected	Share of chromosomes involved in category 1 ^a
13	30/142 (21.1)	6/12 (50.0)
16	25/142 (17.6)	1/8 (12.5) (1 not rescued)
18	35/142 (24.6)	9/11 (81.8)
21	23/142 (16.2)	2/10 (20.0)
22	24/142 (16.9)	1/7 (14.3) (2 not rescued)
X and Y	5/142 (3.5)	1/5 (20.0)

Values are n (%).

^aCategory 1 includes overlapping signals and polymorphisms; 5/7 overlapping signals and 3/3 polymorphisms were rescued, adding up to a total of 28/66 euploid embryos after re-hybridization.

monosomies were found to be chromosomes 18 and 13, with 81.8% and 50.0% of rescued monosomies, respectively. Pathology was confirmed in 80% of monosomies involving chromosome 21 and in 80% involving chromosomes X and Y. The efficiency of monosomy re-hybridization for chromosomes 22 and 16 was not statistically evaluated, as only a few cases were involved in the re-hybridization.

Discussion

The results of probe and probe mixture validation demonstrated inconsistent results in hybridization efficiency for both panels used for testing (PGT panel and PB panel). The overall hybridization efficiency of the PGT panel in the first round and CEP 16/LSI 22 in the second round of hybridization (76–86% for male and 73–90% for female

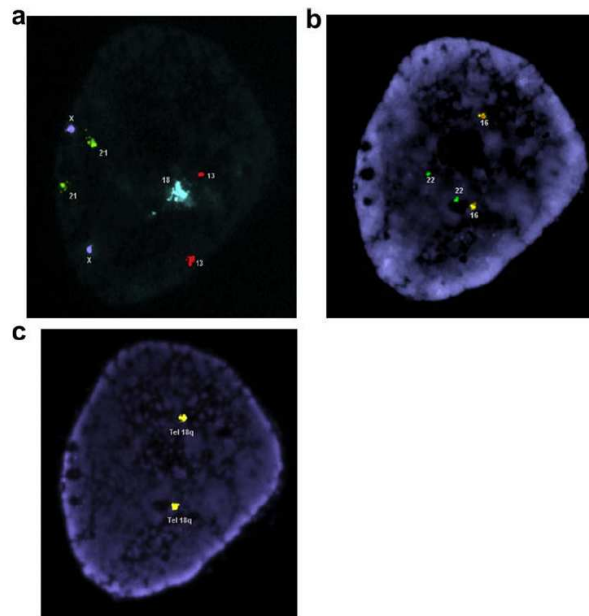


Figure 2. (a) Diffused signal for chromosome 18–MultiVysion PGT panel. (b) Second-round hybridization with probes CEP 16 and LSI 22. (c) Re-hybridization of the same nucleus for chromosome 18 with sub-telomeric probes Tel18q.

lymphocytes) was significantly higher ($P < 0.01$) when compared with the overall hybridization efficiency of the PB panel in the first round and CEP X/Y in the second round of hybridization, which was 58–82% for male lymphocytes and 55–79% for female lymphocytes, respectively (data not shown). These results are comparable with other published studies (Iwarsson *et al.*, 2000; Benadiva and Oris,

2002; Weremowicz *et al.*, 2006). These studies also show that an efficiency of 90–95% is realistic for a single probe, which we were also able to demonstrate (data not shown). The present study, as well as others, confirms that polymorphisms and divergences in the size of repetitive sequences are common in the general population, and this fact supports the necessity of testing parental blood samples

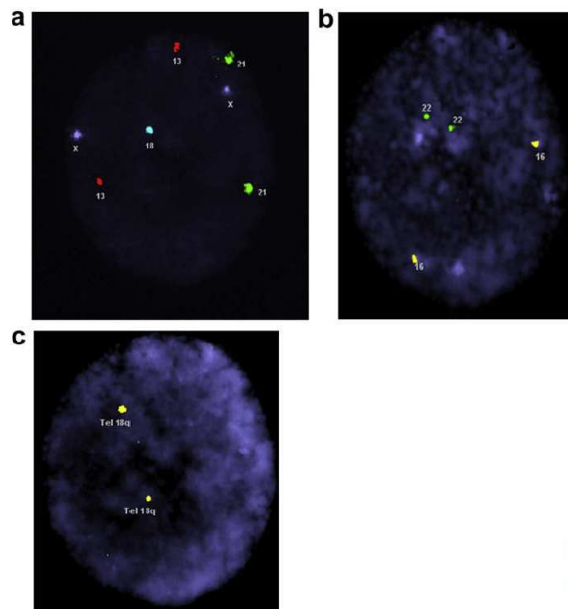


Figure 3. (a) Monosomy 18–MultiVysion PGT panel. (b) Second-round hybridization with probes CEP 16 and LSI 22. (c) Re-hybridization of the same nucleus for chromosome 18 with sub-telomeric probe Tel18q.

(Weremowicz *et al.*, 2001; Yu and Bogil, 2003). Commonly used scoring criteria seem sub-optimal because this involves a subjective evaluation of the chromosome status of nuclei by the observer. This leads to the exclusion of chromatin nuclei that are not of optimal size and quality, and thus the real efficiency of hybridization is underestimated.

Single cells are analysed using PGD and, as outlined above, the results of FISH analysis are influenced by diverse exogenous and endogenous factors: suboptimal quality nuclei are commonly produced. These nuclei have to be analysed and not excluded from scoring as is routinely done. It is therefore beneficial to know which features are associated with these poor-quality nuclei. The results show that poor-quality nuclei are associated with the failure of hybridization, predominantly for chromosome 18 in both the PGT and PB panel and for chromosome 16 in the PB panel (data not shown).

This study also confirms that the probe for chromosome 13, which is labelled in Texas Red, shows the highest background and non-specific hybridization.

Based on these results, the strategy involved testing the five chromosomes 13, 18, 21, X, and Y (PGT panel) in the first round and chromosomes 16 and 22 (CEP 16 and LSI 22) in the second round. Since the PB panel includes chromosomes 16 and 18, this combination produces higher probe efficiency and fewer nuclei with different signal patterns than the PB panel. These two chromosomes show very high rates of polymorphisms and share some sequences that allow these two probes to non-specifically hybridize to the sequences of the other chromosome. Second, chromosome 18 is labelled in aqua and chromosome 16 in blue, which means that the fluorescence spectra are very close to each other and detectable in the aqua as well as in the blue filter. It is therefore sometimes hard to distinguish between those two chromosomes, and if polymorphism is present, the same four signals can be seen in both aqua and blue, which makes it difficult to assess to which chromosome the signals belong.

Since many confounding factors influence the final result of PGD, it is difficult to rate the contribution of the technique itself. The non-existence of an accurate and reliable FISH technique makes it almost obligatory for geneticists to use as many options as possible to increase the accuracy of current analysis.

One of these options is to incorporate the re-hybridization of non-informative results into standard laboratory practice as recommended by the guidelines for good practice in PGD (PGDIS, 2008) and confirmed in the study by Colls *et al.* (2007). Colls *et al.* (2007) provided profound insights into this problem and disclosed possible pitfalls.

The present results are in agreement with this study, and are also in agreement with Colls *et al.* (2007) on the overall benefit of this approach. It was confirmed that chromosome 18 was the chromosome most commonly involved in true monosomies as well as in non-informative results. This chromosome also had the highest percentage of 'rescued'

non-informative results and monosomies, especially if the quality of the chromatin was poor.

Overall, 20.2% non-informative results were re-analysed with the third panel. Consequently, 95.8% ($P < 0.001$) of these results became informative for the tested chromosome/s and enabled a diagnosis without 'no results' in 99% of nuclei ($P < 0.001$). Nuclei without results after a third round of re-hybridization were individually examined and considered for transfer, based on the character of the uncertain result.

If monosomy is not considered as a non-informative result, the rate of non-informative results decreases to 11.2%, which is still higher than the 7.5% published by Colls *et al.* (2007). This discrepancy might be due to the smaller sample size (702 compared with 2609 blastomeres examined), but most probably reflects the application of more stringent scoring criteria. The results clearly demonstrate that almost half of all 'monosomies in question' and more than 70% of 'no results' for tested chromosomes were actually euploid after a third round of hybridization using telomeric probes. The completion of a third round of re-hybridization to the non-informative results in the four categories increased the euploid result from 27% to 39%.

Another problem is the number of tested chromosomes. As the results of probe validation showed, the efficiency of hybridization decreases with the increasing number of probes and FISH rounds. Weremowicz *et al.* (2006) strongly recommend testing only those chromosomes most frequently involved in spontaneous abortions. This study also provides support for the testing of chromosomes that are involved in implantation failure. Analysis of these chromosomes enables detection of all the important chromosomal abnormalities, viable or non-viable, while still allowing the possibility of rescuing non-informative results.

This study clearly demonstrates the importance of re-hybridizing both monosomies and non-informative results. It was possible to resolve 95.8% ($P < 0.001$) of non-informative results, and to gain a general understanding of which features occur most frequently and for which categories of non-informative results re-hybridization is most beneficial.

References

- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M *et al.* 2003 Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reproductive BioMedicine Online* 6, 226–231.
- Baart EB, van den Berg I, Martini E *et al.* 2007 FISH analysis of 15 chromosomes in human day 4 and 5 preimplantation embryos: the added value of extended aneuploidy detection. *Prenatal Diagnosis* 27, 55–63.
- Anguiano A, Sulcova S, Ziebe S *et al.* 2003 Validation of a test for aneuploidy in pre-embryo blastomeres at a USA national reference laboratory. *American Journal of Human Genetics* 73, 597.
- Benadiva C, Oris JJ 2002 Preimplantation genetic diagnosis and assisted reproduction. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America* 13, 489–505.

- Berend SA, Creshaw D, Pritchard P *et al.* 2004 FISH validation of preimplantation genetic diagnosis (PGD). *American Journal of Human Genetics* 75, 502 [Abstract 2800] Presented at the annual meeting of the American Society of Human Genetics, October 26–30, 2004, Toronto, Canada. Available from <http://www.ashg.org/genetics/ashg04/index.shtml>.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A 2002 Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type and relevance to embryo outcome. *Human Reproduction* 17, 413–419.
- Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N *et al.* 2005 Spindle abnormalities in normally developing and arrested human preimplantation embryos in vitro identified by confocal laser scanning microscopy. *Human Reproduction* 20, 672–682.
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N *et al.* 2007 Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using 'no result rescue'. *Fertility and Sterility* 88, 53–61.
- Coonen E, Derhaag JG, Dumolin JC *et al.* 2004 Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 19, 316–324.
- Daphnis DD, Delhanty JD, Jerkovic S *et al.* 2005 Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Human Reproduction* 20, 129–137.
- Henegariu O, Heerema NA, Lowe Wright L *et al.* 2001 Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* 43, 101–109.
- Iwarsson E, Malmgren H, Inzuza J *et al.* 2000 Highly abnormal cleavage division in preimplantation embryos from translocation carriers. *Prenatal Diagnosis* 20, 1038–1047.
- Macklon S, Geraedts J, Fauser BC 2002 Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Human Reproduction Update* 8, 333–343.
- Munné S, Magli C, Bahce M *et al.* 1998 Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenatal Diagnosis* 18, 1459–1466.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z *et al.* 1993 Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 8, 2185–2191.
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) 2008 Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance. *Reproductive BioMedicine Online* 16, 134–147.
- Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P *et al.* 2000 FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenatal Diagnosis* 20, 552–560.
- Velilla E, Escudero T, Munné S 2002 Blastomere fixation technique and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reproductive BioMedicine Online* 4, 210–217.
- Weremowicz S, Sandstrom DJ, Morton CC *et al.* 2006 Validation of DNA probes for preimplantation genetic diagnosis (PGD) by fluorescence in situ hybridization (FISH) R1. *Prenatal Diagnosis* 26, 1042–1050.
- Weremowicz S, Sandstrom DJ, Morton CC *et al.* 2001 Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. *Prenatal Diagnosis* 21, 262–269.
- Wilton L 2002 Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenatal Diagnosis* 22, 312–318.
- Yu C, Bogil J 2003 False negative interphase FISH assay on three prenatal cases of trisomy 18. *American Journal of Human Genetics* 73, 601.
- Zech NH, Lejeune B, Puissant F *et al.* 2007 Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo transfer: day 3 versus day 5. *Fertility and Sterility* 88, 244–246.

Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

Received 13 November 2008; refereed 2 December 2008; accepted 13 May 2009.

Příloha č. 2.

Vanderzwalmen, P., Hiemer, A., Rubner, P., Bach, M., Neyer, A.,
Stecher, A., **Uher, P.**, Zintz, M., Lejeune, B., Vanderzwalmen, S.,
Cassuto, G., Zech, N.H.

Blastocyst development after sperm selection at high magnification is
associated with size and number of nuclear vacuoles.

Reprod Biomed Online. 2008, roč. 17, č. 5, s. 617-627.

IF=3,21.

Article

Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles



Pierre Vanderzwalmen

Pierre Vanderzwalmen entered the field of embryology in 1978 at the University of Liege after graduating as engineer in biotechnology and biochemistry. With Professor Massip, he reported in 1986 the first live birth after vitrification of mouse and cow embryos. From 1989 to 2003, he worked at the Schoysman Infertility Management Foundation, obtaining the first TESE baby in the world. As Senior Clinical Embryologist, he now coordinates the scientific IVF activities of the Institute for Reproductive Medicine and Endocrinology in Bregenz and the Centre Hospitalier Inter Regional Cavell (CHIREC) in Brussels. His current research interests are focused on vitrification of oocytes and embryos, on sperm selection and on dynamic embryo culture techniques.

Pierre Vanderzwalmen^{1-3,7,8}, Antje Hiemer^{1,7}, Paul Rubner¹, Magnus Bach¹, Anton Neyer¹, Astrid Stecher¹, Petr Uher², Martin Zintz¹, Bernard Lejeune³, Sabine Vanderzwalmen³, Guy Cassuto⁴, Nicolas H Zech⁵

¹Institute for Reproductive Medicine and Endocrinology, Bregenz, Austria; ²Institute for Reproductive Medicine and Endocrinology, Pilsen, Czech Republic; ³Centre Hospitalier Inter Régional Cavell (CHIREC), Braine l'Alleud, Bruxelles, Belgium; ⁴Laboratoire Drouot, Paris, France; ⁵Reproductive Genetics Institute, 2825 N Halsted, Chicago, IL 60657, USA and Department of Obstetrics, University Hospital Zurich, Switzerland

⁷Contributed equally to this paper.

⁸Correspondence: e-mail: pierrevdz@hotmail.com

Abstract

Spermatozoa selection at high magnification before intracytoplasmic sperm injection seems to be positively associated with pregnancy rates after day 3 embryo transfers. The aim was to demonstrate an association between the presence of vacuoles in sperm nuclei and the competence of embryos to develop to day 5. Grading of spermatozoa at $\times 6000$ – $\times 12,500$ magnification: grade I, no vacuoles; grade II, ≤ 2 small vacuoles; grade III, ≥ 1 large vacuole; grade IV, large vacuoles with other abnormalities. The outcome of embryo development in a group of 25 patients after sibling oocyte injection with the four different grades of spermatozoa showed no significant difference in embryo quality up to day 3. However, the occurrence of blastocyst formation was 56.3 and 61.4% with grade I and II spermatozoa respectively, compared with 5.1% with grade III and 0% with grade IV respectively ($P < 0.001$). Spermatozoa selection at high magnification using Nomarski interference contrast is useful to identify more precisely the size and the number of nuclear vacuoles that greatly exert a negative effect on embryo development to the blastocyst stage. These observations confirm previous studies pointing to possible 'early and late paternal effects', both of which may have an impact on early embryonic development.

Keywords: blastocyst, ICSI, IMSI, sperm nuclei, vacuole

Introduction

With the introduction of a new concept for observing spermatozoa called 'motile-sperm organelle-morphology examination' (MSOME), it is now possible to examine the fine nuclear morphology of motile spermatozoa in real time at a magnification of up to $\times 6600$ using Nomarski differential interference contrast (Bartoov *et al.*, 2001). Bartoov *et al.* (2001, 2002) report on the benefit of selecting spermatozoa using such a technique. As a consequence, they established a new intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure called intracytoplasmic morphologically selected sperm injection

(IMSI). It is now well accepted that, unlike IMSI, the classic method of selecting spermatozoa at $\times 400$ magnifications has severe limitations: a large panel of malformations that may negatively influence the outcome of embryo development go undetected.

Several publications report that the selection of spermatozoa with normal nuclear shapes at high magnification is positively associated with pregnancy rates after day-3 embryo transfers in couples with previous and repeated implantation failures

Article - Effect of sperm selection on blastocyst development - P Vanderzwalmen *et al.*

(Bartoov *et al.*, 2002, 2003; Junca *et al.*, 2004; Berkovitz *et al.*, 2006a) and in patients with an elevated degree of DNA fragmented spermatozoa (Hazout *et al.*, 2006).

If no normal spermatozoa can be found, the only alternative is to choose those that are morphologically second best. Berkovitz *et al.* (2005, 2006a) report low fertilization rates and a low percentage of top quality embryos on day 3 after IMSI with spermatozoa exhibiting a large panel of nuclear malformations in terms of shape, size and the presence of vacuoles.

In a recent paper, Berkovitz *et al.* (2006b) analysed more specifically the impact of nuclear vacuoles in the head of spermatozoa on pregnancy outcome. They concluded that spermatozoa of normal nuclear shape and with large vacuoles negatively influence pregnancy and implantation rates as compared with a control group containing spermatozoa of normal nuclear shape and content. Furthermore, they demonstrated an association between defective spermatozoa and higher early abortion rates, despite no apparent decrease in embryo quality on day 3.

If no apparent early paternal effects on embryo development up to day 3 can be observed when oocytes are fertilized by spermatozoa with large vacuoles in the sperm head, an intriguing question arises: does the presence of such nuclear vacuoles, which cannot be detected with conventional ICSI at $\times 200$ or $\times 400$ magnification, influence the embryo's capacity to develop to the blastocyst stage? This would suggest the presence of a late paternal effect that impacts embryo development after the onset of paternal DNA content contribution to embryonic development, which starts around day 3 after fertilization (Tesarik *et al.*, 2005).

One of the most frequent questions with regard to IMSI relates to its indications and if IMSI can be seen as a useful tool in addition to conventional ICSI in certain cases. It is generally acknowledged that for patients with previous failure of implantation or for patients with high level of DNA fragmentation, IMSI is a good option (Bartoov *et al.*, 2003; Berkovitz *et al.*, 2006a; Hazout *et al.*, 2006). There is a great heterogeneity between all the semen samples, so that the frequency by which good spermatozoa can be selected varies greatly from one patient to the other. As a consequence, the fundamental question to elucidate concerns the probability with which a normal spermatozoon can be selected with the classical ICSI method under $\times 400$ magnification.

In order to clarify these issues, a study was designed to determine whether the existence of vacuoles in the nuclei of spermatozoa affects embryo development to the blastocyst stage.

In answer to this question, preliminary results are presented in which the percentage of selected normal spermatozoa was analysed after classical ICSI in relation to the percentage of normal forms present in the sample and detected using the high magnification methodology IMSI.

Materials and methods

The study was conducted between September and December 2006 on couples entering the ICSI programme as a result of male

factor infertility. In order to minimize the influence of female factor infertility, only those couples were eligible to enter the study in which the woman was younger than 40 years [mean age 36.7 ± 2.1 (SD)] and had at least eight oocytes available upon oocyte retrieval.

The couples were informed that their oocytes would be injected after selecting spermatozoa with the help of IMSI instead of ICSI.

A sperm washing procedure was performed after centrifugation on three layers gradient of pure sperm (Nidacon, Sweden), as described previously (Vanderzwalmen *et al.*, 1991).

For IMSI, different droplets were placed into glass-bottomed dishes (Willeo wells, Amsterdam, The Netherlands). An elongated polyvinylpyrrolidone (PVP) drop (Ferti pro, Bornem, Belgium) was placed adjacent to a maximum of 2 drops of human tubal fluid (HTF)-HEPES (IVFonline, Canada), each containing one oocyte. A smaller drop of HTF medium contain the spermatozoa was placed close to the PVP drop. The drops were covered with sterile mineral oil (Cryo Biosystems, l'Aigle, France).

At the start of IMSI, spermatozoa were inserted into the small drop and a small bridge was created to the PVP drop in order to allow the motile spermatozoa to swim to the PVP drop.

A first selection of motile spermatozoa in the PVP drop was made at $\times 630$ – 1000 magnification under a Normarski interferential Leica AM 6000 inverted microscope (Leica, Germany). If possible, spermatozoa that were selected displayed a normal oval head shape as well as absence of both cytoplasmic extrusions and tail defects. Using a variable zoom lens (HC VarioC-mount; Leica), it was possible to evaluate, after immobilization, the morphology on the monitor at magnifications ranging between $\times 6600$ and $\times 12,000$ and photo-documented them for subsequent classification. The primary intention was to choose spermatozoa without vacuoles for injection into the oocytes. Depending on the degree of sperm morphology impairment, the time required to select the best sperm ranged between 2 and 15 min. When it became obvious after 15 min that spermatozoa of a normal appearance could not be found, the second-best spermatozoa with the least number of vacuoles and/or other abnormalities was selected for injection. In such situations, it is difficult to decide when to stop the search for a normal spermatozoon. It can take 15 min and longer, and this also depends on the number of oocytes that have to be injected.

Since the influence of the size and number of vacuoles on the outcome of embryo development was unknown, it was necessary to establish a new grading system. Small ($<4\%$ of the head volume) or big vacuoles were defined according to the analysis made by Bartoov and colleagues (2003). The spermatozoa were graded and classified into four groups according to the presence or size of vacuoles: grade I, absence of vacuoles (Figure 1A); grade II, maximum of two small vacuoles (Figure 1B,C); grade III, more than two small vacuoles (Figure 1D) or at least one large vacuole (Figure 1E); grade IV, large vacuoles in conjunction with abnormal head shapes or other abnormalities (Figure 1F).

After selecting the best spermatozoon with IMSI and immobilization, injection was performed as described

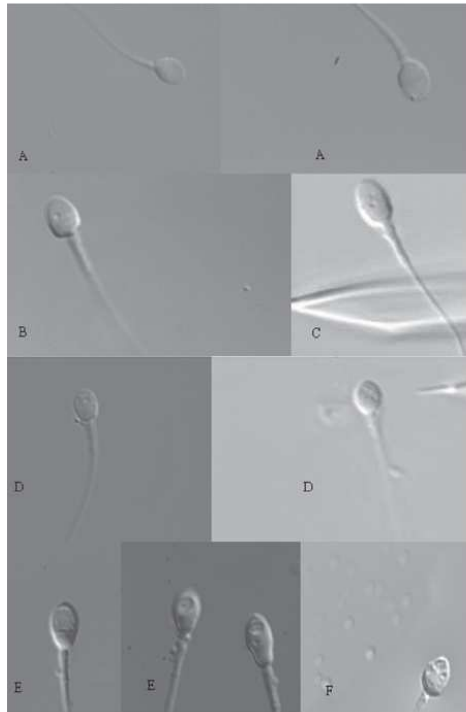


Figure 1. Grading of spermatozoa into four groups according to the presence or size of the vacuoles. Grade I: normal form and no vacuoles (A). Grade II: normal form and ≤ 2 small vacuoles (B, C). Grade III: normal form, >2 small vacuoles or at least one large vacuole (D, E); Grade IV: large vacuole and abnormal head shapes or other abnormalities (F). Original magnification $\times 6600$.

previously for conventional ICSI (Vanderzwalmen *et al.*, 1996) at $\times 200$ and $\times 400$ magnification. Oocytes were placed into the dish one at a time to minimize the amount of time outside the incubator.

Fertilized oocytes were cultured individually in 4-well multidishes (Nunc), each well containing 800 μl of non-sequential Global medium (LifeGlobal, Ontario, Canada) supplemented with 7.5% human serum albumin (LifeGlobal) at 37°C in a humidified atmosphere of 6% CO_2 in air. Sixteen to 20 h post-ICSI, all oocytes were checked for the presence of two pronuclei. On day 3 of culture, the quality of the embryos was evaluated. They were classified into one of three groups according to the number and size of blastomeres, the percentage of fragmentation and the presence of multinucleated blastomeres. The 'good' quality group consisted of embryos with six or eight cells, no fragmentation and even-sized blastomeres. The 'moderate' quality group consisted of embryos with six to

eight cells, 30–50% fragmentation or uneven-sized blastomeres. Embryos with fewer than six blastomeres and/or more than 50% fragmentation and uneven-sized blastomeres were classified as 'poor' quality embryos.

On day 5, embryo quality was recorded and assessed according to the degree of blastocoele expansion and the quality of both the inner cell mass (ICM) and the trophectoderm. Blastocysts and expanded blastocysts containing a lot of tightly packed ICM and many cells forming a cohesive epithelium were classified as 'excellent'. Early blastocysts or blastocysts and expanded blastocysts with a small amount of tightly packed ICM and/or large cells forming the epithelium were classified as 'moderate'.

The likelihood of selecting a normal spermatozoon, at $\times 400$ magnification, before oocyte injection was analysed on 15 semen samples (Figure 2).

In a first step, a spermocytogram was established in real time at magnification on the screen at $\times 6600$ or at $\times 1000$ magnification under the objectives (Figure 3A,B). A total of 100 spermatozoa were analysed and the percentage of grade I and II spermatozoa was recorded. In a second step, 30 morphologically normal spermatozoa were selected in the PVP drop using the conventional ICSI approach at $\times 400$ or $\times 1000$ magnification under Hoffman modulation contrast (Figure 3C,D). After this first selection, the spermatozoa were aspirated into a needle and moved from the plastic Petri dish into a glass-bottomed dish and immobilized. The percentage of grade I and II spermatozoa was analysed at higher magnification under differential interference contrast of Normarski. In the last phase of the experiment, 30 grade I and II spermatozoa were searched using the IMSI procedure at minimal $\times 6600$ magnification on the screen or at $\times 1000$ magnification under the objectives.

Statistical analysis

The chi-squared test was used to analyse differences in embryo development after oocyte injection within all four categories of spermatozoa qualities. A multiple comparison analysis with Bonferroni adjustment of α was done to analyse differences pairwise. A two-tailed Student's *t*-test was performed to exclude or show statistically significant differences concerning age and number of oocytes per patient. *P*-values below 0.05, or below 0.009 after Bonferroni adjustment were considered as statistically significant.

Results

During a 4-month period a total of 67 couples were involved in 67 IMSI-ICSI cycles. That resulted in 442 metaphase II (MII) oocytes becoming available for injection (Figure 4). For each IMSI-ICSI attempt, the selection policy consisted of attempting to select the best spermatozoa out of the prepared semen sample. However, the quality of the spermatozoa selected differed greatly from one attempt to the next, so that even after extensive searching it was impossible, in some semen samples, to find spermatozoa free of abnormalities. Only 7.0% ($n = 31$) of spermatozoa selected were completely free of any abnormalities (grade I). The majority of the spermatozoa presented small (grade II, 59.7%; $n = 264$) or large (grade III,

Article - Effect of sperm selection on blastocyst development - P Vanderzwalmen et al.

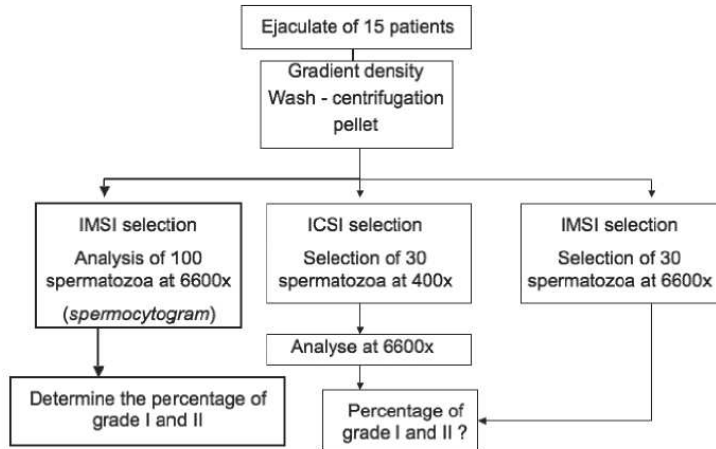


Figure 2. Experimental design. Probability of selecting 30 grade I and II spermatozoa at $\times 400$ or $\times 6600$ magnification in relation to the percentage of normal spermatozoa present in the sample and assessed at $\times 6600$. ICSI = intracytoplasmic sperm injection; IMSI = intracytoplasmic morphologically selected sperm injection.

20.4%; $n = 90$) nuclear vacuoles. The remaining spermatozoa contained in addition to vacuoles other abnormalities (grade IV, 12.9%; $n = 57$).

According to the grade of spermatozoa selected, three groups of patients were defined (Figure 5). In the first group of 25 patients (37%), oocytes were injected with different quality grades of spermatozoa because insufficient numbers of grade I and II spermatozoa were available. In the second group with 34 (51%) different patients, it was possible to find and inject all 209 oocytes with grade I and II spermatozoa. In a third group of eight patients (12%), even after extensive searching as described above, only grade III and IV spermatozoa were found and selected for injection in 69 oocytes.

Table 1 illustrates the rate of zygote, day-3 embryo and blastocyst formation in a group of 25 patients after oocyte injection of grade I, II, III and IV spermatozoa. When all groups were analysed together, no statistically significant difference could be found between the four groups concerning the number zygotes and embryo development to day 3, including the subgroup analysis. On the other hand, the four groups differ highly significantly in their development to blastocysts and good quality blastocysts. In the subgroup analysis, no statistically significant difference could be shown between groups I and II and between groups III and IV concerning the development to blastocysts. Therefore, it was permissible in this study to combine groups I and II ($n = 86$) and groups III and IV ($n = 78$) for further analysis (Table 2). There was no statistically significant difference in the number of injected oocytes per patient. Even in the combined groups there is no difference concerning the embryo development to day 3 (group I/II: 88.4% versus group III/IV: 82.1%). However, blastocyst formation rate was associated with the grade of injected spermatozoa (Table 2). After injection with grade I and grade II spermatozoa, 60.5 and 37.2% of the injected oocytes developed to the blastocyst and good blastocysts stage respectively. Conversely, after IMSI with

compromised spermatozoa (grade III and grade IV), only 3.8 and 1.3% of embryos developed to the blastocyst and good quality blastocyst stage ($P < 0.001$).

The same trend was observed when the data between the other two groups of patients (34 versus 8) with different grades of spermatozoa injected (Table 3) were analysed. No significant difference in the number of oocytes per patient was observed. Although a significantly higher number of MII oocytes/patient ($P < 0.01$) were injected with grade III and IV spermatozoa, the percentage of blastocysts (10.1%) was significantly lower as compared with MII oocytes injected with grade I and II spermatozoa (43.5%) ($P < 0.001$). Similarly, the rate of good quality blastocysts was significantly reduced when grade III/IV (2.9%) spermatozoa were injected as compared with the use of grade I/II spermatozoa (19.1%) ($P < 0.01$).

Outcome and probability of selecting grade I/II spermatozoa with ICSI or IMSI approach are shown in Table 4. According to the percentage of grade I and II spermatozoa observed at high magnification under Nomarski optics, sperm samples were classified into three categories (category I: $>40\%$ normal sperm forms; category II: between 20 and 40% normal sperm forms and category III: $<20\%$ normal sperm forms) (Figure 2).

As shown in Table 4, even though it was possible to capture grade I/II spermatozoa to some extent with ICSI pre-selection, the success rate was much lower than when working directly with the IMSI selection approach. In category I, the likelihood of selecting grade I/II spermatozoa using the ICSI selection procedure ranged from 50 to 67%. However, when the selection was performed directly at high magnification (IMSI), it was possible to select normal spermatozoa in 100% of cases. In category III it was possible to harvest on average 55% of grade I/II spermatozoa using the IMSI selection approach compared with 22% when applying the ICSI selection approach.

RBMOnline®

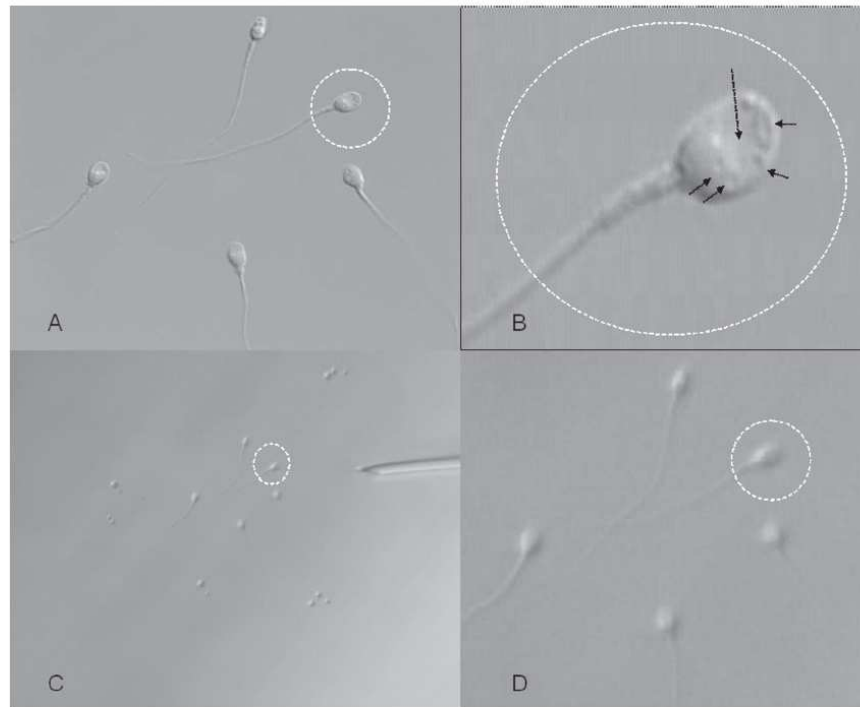


Figure 3. Spermatozoa with Nomarski and Hoffman optic systems at different magnifications. (A) Nomarski differential interference contrast at $\times 1000$ magnification ($\times 100$ DIC objective). (B) Nomarski differential interference contrast at $\times 12,000$ magnification ($\times 100$ DIC objective plus VarioC-mount Zoom). (C) Hoffman modulation contrast at $\times 400$ magnification ($\times 40$ HMC objective). (D) Hoffman modulation contrast at $\times 1000$ magnification ($\times 40$ HMC objective plus VarioC-mount Zoom). Short arrow: small vacuoles; long arrow: large vacuole.

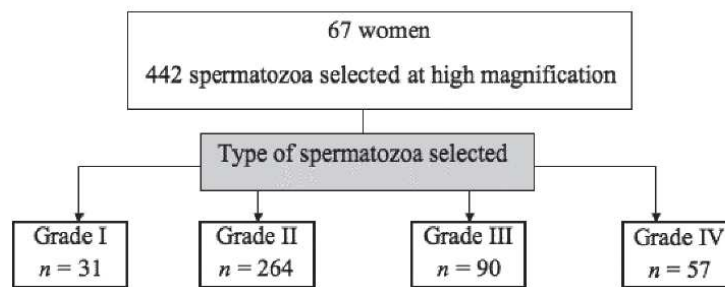


Figure 4. Distribution of selected spermatozoa using the intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) approach.

Article - Effect of sperm selection on blastocyst development - P Vanderzwalmen et al.

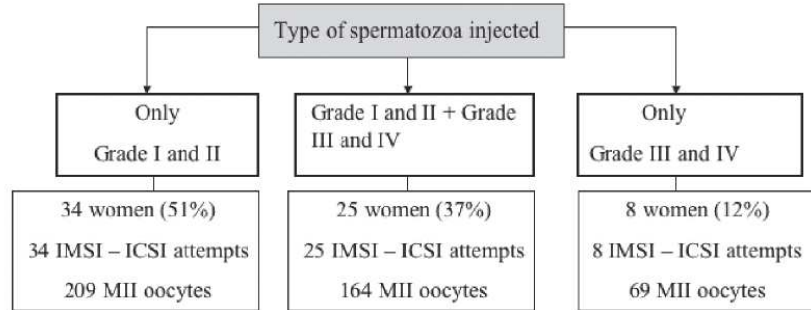


Figure 5. Experimental design: spermatozoa grading and groups of patients according to the types of spermatozoa selected at high magnification. ICSI = intracytoplasmic sperm injection; IMSI = intracytoplasmic morphologically selected sperm injection; MII = metaphase II.

Table 1. (a) Outcome of embryo development in a group of 25 patients after sibling oocytes were injected with grade I, grade II, grade III and grade IV spermatozoa. (b) Chi-squared test results.

a				
Type of injected spermatozoa	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
No. injected oocytes	16	70	59	19
Percentage (no.) of embryos per injected oocyte				
Zygotes	87.5 (14)	90.0 (63)	94.9 (56)	52.6 (10)
Day-3 embryos	87.5 (14)	88.6 (62)	93.2 (55)	47.4 (9)
Good quality day-3 embryos	43.8% (7)	42.9 (30)	33.9 (20)	21.1 (4)
Blastocysts	56.3% (9)	61.4 (43)	5.1 (3)	0 (0)
Good quality blastocysts	37.5% (6)	37.1 (26)	1.7 (1)	0 (0)

b							
Grade of spermatozoon	All groups	Multiple comparison analysis (P-values)					
		I versus II	I versus III	I versus IV	II versus III	II versus IV	III versus IV
Injected oocytes versus							
Zygotes	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day-3 embryos	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Good quality day-3 embryos	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Blastocysts	<0.001	NS	<0.001	0.003	<0.001	0.001	NS
Good quality blastocysts	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.001	NS	NS

Significance level $P < 0.009$ after Bonferroni adjustment, NS = not statistically significant.

Table 2. Outcome of embryo development in a group of 25 patients after sibling oocytes were injected with grade I/II and grade III/IV spermatozoa.

Characteristics	Value		
No. of patients	25		
Women's age (years, mean \pm SD)	36.2 \pm 2.5		
No. of oocytes (mean \pm SD)	247 (9.9 \pm 1.6)		
No. of MII oocytes (mean \pm SD)	198 (7.9 \pm 1.8)		
No. of MII oocytes for injection: (mean \pm SD)	164 (6.6 \pm 1.4)		
Results			
Type of injected spermatozoa	Grade I/II	Grade III/IV	P-value
No. of injected oocytes (mean \pm SD)	86 (3.4 \pm 0.9)	78 (3.12 \pm 1.0)	NS
Percentages (no.) of embryos per injected oocyte			
Zygotes	89.5 (77)	84.6 (66)	NS
Day-3 embryos	88.4 (76)	82.1 (64)	NS
Good quality day-3 embryos	43.0 (37)	30.8 (24)	NS
Blastocysts	60.5 (52)	3.8 (3)	<0.001
Good quality blastocysts	37.2 (32)	1.3 (1)	<0.001
No. of embryo transfers	25		
No. embryos transferred (mean)	34 (1.4)		
No. of deliveries (%)	5 (20.0)		
Implantation rate %	20.6 ^a		

^aTwo twins.

MII = metaphase II; NS = not statistically significant.

Table 3. Outcome of embryo development in a group of 34 and eight patients in which only grade I/II or grade III/IV spermatozoa respectively were available for injection.

Characteristics	Grade I/II	Grade III/IV	P-value
No. of patients	34	8	–
Women's age (mean \pm SD)	37.0 \pm 1.8	37.0 \pm 1.9	NS
No. of oocytes (mean \pm SD)	310 (9.1 \pm 1.2)	85 (10.6 \pm 1.4)	NS
No. of MII oocytes (mean \pm SD)	244 (7.2 \pm 0.9)	74 (9.2 \pm 1.0)	<0.01
No. MII oocytes for injection (mean \pm SD)	209 (6.1 \pm 1.0)	69 (8.6 \pm 1.1)	<0.01
Results			
Type of injected spermatozoa	Only grade I/II	Only grade III/IV	P-value
No. of injected oocytes	209	69	–
Percentages (no.) of embryos per injected oocytes			
Zygotes	88.5 (185)	79.7 (55)	NS
Day 3 embryos	87.1 (182)	66.7 (46)	NS
Good quality day-3 embryos	31.1 (65)	17.4 (12)	NS
Blastocysts	43.5 (91)	10.1 (7)	<0.001
Good quality blastocysts	19.1 (40)	2.9 (2)	<0.01
No. of embryo transfers	34	8	–
No. of embryos transferred (mean)	52 (1.6)	9 (1.1)	–
No. of deliveries (%)	15 (44)	1 (12.5)	–
Implantation rate (%)	34.6 ^a	11.1	–

^aThree twins.

MII = metaphase II; NS = not statistically significant.

Table 4. Outcome of selecting 30 grade I and II spermatozoa at $\times 400$ or $\times 6600$ magnification in relation to the percentage of normal spermatozoa present in the sample and assessed at $\times 6600$ magnification.

Semen sample evaluated by spermzytogram	Percentage (no.) of grade I and II after:		
	Selection of spermatozoa and IMSI evaluation (spermzytogram approach)	Pre-selection at $\times 400$ followed by IMSI evaluation (ICSI selection approach)	Direct IMSI selection and evaluation (IMSI selection approach)
1	47 (100)	50 (30) 15	100 (30) 30
2	48 (100)	73 (30) 22	100 (30) 30
3	47 (100)	67 (30) 20	100 (30) 30
Average	47	63	100
4	26 (100)	40 (30) 12	100 (30) 30
5	33 (100)	47 (30) 14	100 (30) 30
6	29 (100)	70 (30) 21	100 (30) 30
7	38 (100)	43 (30) 13	93 (30) 28
8	39 (100)	43 (30) 13	53 (30) 16
Average	33	49	89
9	19 (100)	30 (30) 9	67 (30) 20
10	16 (100)	23 (30) 7	40 (30) 12
11	13 (100)	27 (30) 8	67 (30) 20
12	11 (100)	33 (30) 10	53 (30) 16
13	7 (100)	20 (30) 6	63 (30) 19
14	3 (100)	13 (30) 4	57 (30) 17
15	3 (100)	7 (30) 2	40 (30) 12
Average	10	22	55
Total	25 (379/1500)	39 (176/450)	76 (340/450)

ICSI = intracytoplasmic sperm injection; IMSI = intracytoplasmic morphologically selected sperm injection.

Semen samples 1-3: >40% normal sperm forms; semen samples 4-8: between 20 and 40% normal sperm forms and semen samples 9-15 <20% normal sperm forms.

Discussion

The introduction of the Normarski optic system permits the fine nuclear morphology of motile spermatozoa to be observed in real time at high magnification. This meticulous approach towards sperm selection allows identification of vacuole(s) in the sperm head that are otherwise not evident to detect at $\times 400$ magnification with Hoffman modulation contrast. However, as noticed already earlier by Berkovitz *et al.* (2005, 2006a, b), in spite of having a more precise selection method at hand, it is not always possible even with this tool to find and select morphologically completely normal appearing spermatozoa for fertilization. Thus, in such situations, second choice spermatozoa with the least vacuoles and/or abnormal shape have to be used.

The policy of embryo culture to the blastocyst stage gives the opportunity to ascertain whether vacuoles in the spermatozoa have a negative effect on embryo development, and whether such an effect occurs before or after the genomic transition that takes place around 72 h after fertilization. So far as is known, this is the first report that describes a negative impact of the presence of one large nuclear vacuole or several small ones in the head of spermatozoa on the competence of embryos to develop to blastocysts. Moreover, in addition to a reduction of the proportion of good quality embryos that develop to

the blastocyst stage, the presence of vacuoles in the nuclei of spermatozoa is also associated with diminished pregnancy and implantation rates.

The present data and those of Berkovitz *et al.* (2006b) and Hazout *et al.* (2006) are further substantiated by studies on several species (bulls, stallions, rabbits) indicating increased rates of early embryonic death and reduced fertility after fertilization of oocytes with spermatozoa showing nuclear vacuoles (Barth and Oko 1988; Thundathil *et al.*, 1998). Although the negative effects of large nuclear vacuoles or several small ones on embryo development after day 3 are becoming more and more evident, the underlying cause is still not understood. As a consequence, one of the top priorities for future studies has to be to investigate their origin and meaning, how they influence embryo development and what effects they have on the health of the progeny.

Some studies argue that there is a correlation between chromatin defects and the presence of vacuoles. A significant negative correlation between the size of nuclear vacuoles and chromatin stability is reported by Berkowitz *et al.* (2005) using the sperm chromatin structure assay. Gopalkrishnan *et al.* (2000) found that poor semen quality is associated with repeated early pregnancy loss. In their study, the chromatin material of spermatozoa from men whose partners presented with early

pregnancy loss was often found to be either compact or partially compact with irregular nuclear borders and larger vacuoles. Hazout *et al.* (2006) suggest that the presence of vacuoles may reflect molecular defects responsible for abnormal chromatin remodelling during sperm maturation.

Recently, two papers have reinforced the concept that an association between DNA damage and the presence of nuclear vacuoles exist. Garolla *et al.* (2008) observed significantly better mitochondrial function, chromatin status and less aneuploidy rates when nuclear vacuoles were absent. Franco *et al.* (2008) demonstrated an association between large vacuoles in the sperm and DNA damage. They postulate that the high levels of denatured DNA in sperm with large nuclear vacuoles point to precocious decondensation and desegregation of sperm chromatin fibres.

The allocation of vacuoles to errors at the level of the DNA or chromatin has to be done in future studies. In addition, the morphological aspect of vacuoles itself and their localization has to be evaluated and related to the nuclear integrity of the spermatozoa. It would be very important to execute such studies in the near future. As it becomes more and more evident that there might be an association between DNA damage and the presence of nuclear vacuoles, the attitude towards and the follow-up of patients who show semen samples carrying 100% large vacuoles might have to change.

Irreparable abnormalities of the paternal genome may affect blastocyst development (Jones *et al.*, 1998). The argument that the oocyte supplies all the primary material (proteins and RNA) and that the spermatozoa and their DNA only play a secondary role most probably needs to be revised (Krawetz, 2005). Spermatozoa contain almost 3000 different kinds of mRNA, some of which contain the code for proteins needed for early embryo development. The present observations reinforce previous studies pointing to possible 'early and late paternal effects', both of which may have an impact on early embryonic development (Vanderzwalmen *et al.*, 1991; Shoukir *et al.*, 1998; Tesarik *et al.*, 2004; Tesarik, 2005).

An unwanted high degree of sperm decondensation (disruption of disulphide bridges) can result in asynchronous chromosome condensation, and may lead to cytoplasmic fragments in the embryo (Ménézo *et al.*, 2007). It is now generally accepted that abortive apoptosis during meiosis I or faulty chromatin remodelling during spermiogenesis and oxidative stress may cause sperm DNA fragmentation that is related to embryo development to the blastocyst stage (Seli *et al.*, 2004; Virro *et al.*, 2004; Muriel *et al.*, 2006) and with pregnancy outcome (Larson *et al.*, 2000; Nasr-Esfahani *et al.*, 2005). According to Hanmadeh *et al.* (2000), the integrity of the sperm chromatin may play an as yet underestimated role for embryo development, particularly after fertilization with ICSI, where most of the natural selection mechanisms are bypassed. The transfer of embryos resulting from the fertilization of oocytes with spermatozoa showing high DNA fragmentation indices have low implantation rates (Virro *et al.*, 2004; Nasr-Esfahani *et al.*, 2005). However, although the implantation rate is low with such spermatozoa, deliveries are nonetheless observed. Berkovitz *et al.* (2007) recently reported that the chance of having a healthy child following IMSI treatment is higher compared with conventional ICSI treatment.

Aitken *et al.* (2007) already outlined the possible negative influences of sperm DNA fragmentation both on pregnancy outcome and the next generation. Furthermore, Fernandez-Gonzalez *et al.* (2008) showed in the murine model that oocytes fertilized with DNA-fragmented spermatozoa can generate effects that emerge during later life, such as aberrant growth, premature ageing, abnormal behaviour and mesenchymal tumours. Thus, based on clinical/laboratory findings of the repercussions of possible DNA damage for offspring (Carrell, 2008) and considering that sperm nuclear vacuoles are evaluated more precisely by MSOME, it can be anticipated that such selection approaches will most probably substitute ICSI in the near future.

It was possible to demonstrate that, even after extensive search with IMSI the frequency of detecting spermatozoa of normal morphological appearance or at least ones with a maximum of two small vacuoles greatly varies according to semen samples. In more than 50% of cases, selection of spermatozoa without any abnormalities (grade I) was not possible (personal observation). The results of the present study, which analysed the frequency of finding a normal spermatozoon and showed no abnormalities, reinforce the usefulness of IMSI. It can be assumed that if selection had been performed on the same sperm population using the classic ICSI approach, the likelihood of selecting spermatozoa with a large nuclear vacuole or multiple ones as well as concomitant effects on embryo development would have been very high.

Initially IMSI was proposed to patients with several implantation failures (Bartoov *et al.*, 2002, 2003; Junca *et al.*, 2004; Berkovitz *et al.*, 2006a) and high degree of DNA fragmentation (Hazout *et al.*, 2006). However, in light of the present findings, it may be justifiable to also offer IMSI to those patients where a previous spermzytogramme at high magnification reveals a high percentage of vacuoles. Prior screening of semen samples for the presence of vacuoles would therefore be useful in order to recommend ICSI or IMSI to patients. The establishment of new classification criteria, based on an assessment system, seems a valuable approach to determine a threshold limit for making the right therapeutic decision (Cassuto *et al.*, 2007).

Several articles (Sakkas *et al.*, 1998; Shoukir *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2001; Zech *et al.*, 2002) show that ICSI embryos have a significantly lower chance of developing to the blastocyst stage compared with those that result from routine IVF. The present results may explain why the percentage of blastocysts may be lower after ICSI using normal spermatozoa as compared with the IVF group. In fact, the probability of injecting spermatozoa containing vacuoles is high when using normal ICSI. The zona pellucida (ZP) acts as a selective biological barrier to abnormal spermatozoa, so that in most cases only normal spermatozoa are able to fertilize an oocyte. In a recent article, Liu and Baker (2007) reported that sperm binding to human ZP is highly selective for double-stranded DNA. They conclude that the sperm-ZP binding process plays an important role in the selection of sperm with normal motility and morphology as well as of spermatozoa with normal chromatin DNA. During ICSI, the ZP barrier is breached and a subjective selection of spermatozoa by the biologist at $\times 400$ magnification may increase the probability of injecting cells containing vacuoles. Although some morphological abnormalities may be detected at $\times 400$ magnification, others can only be detected using

special optical equipment. Berkovitz *et al.* (2006a,b) report a dramatic decrease in the ongoing pregnancy rate after performing ICSI if all the spermatozoa within the ejaculate exhibit large nuclear vacuoles.

This study confirms that IMSI is a powerful research tool for investigating spermatozoa carrying several abnormalities that cannot be detected during a conventional ICSI procedure.

Evaluating the presence of vacuoles may significantly upgrade the prognostic information provided by conventional ICSI. It shows that the present morphological criteria used on days 2 or 3 to select embryos, especially in the case of single embryo transfer, are of limited value. Prolonging embryo culture until day 5 may be a better strategy with which to correctly identify and select from a cohort those embryos with a higher overall probability of successful implantation, especially in the case of single blastocyst transfer (Papanikolaou *et al.*, 2006; Zech *et al.*, 2007).

This study has shown that vacuoles exert a negative effect on embryo development. The next step will be to research their origin and identify the conditions under which the frequency of such vacuoles increases.

References

- Aitken R 2007 Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online* 14, 727–733.
- Barth AD, Oko RJ 1988 Defects of the sperm head. In: Barth AD, Oko RJ (eds) *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. IS Iowa State University Press, Ames, pp. 130–192.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F *et al.* 2003 Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertility and Sterility* 80, 1413–1419.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F *et al.* 2002 Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF–ICSI outcome. *Journal of Andrology* 23, 1–8.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F 2001 Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *New England Journal of Medicine* 345, 1067–1068.
- Berkovitz A, Eltes F, Paul M *et al.* 2007 The chance of having a healthy normal child following intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection (IMSI) treatment is higher compared to conventional IVF–ICSI treatment. *Fertility and Sterility* 88, S20.
- Berkovitz A, Eltes F, Lederman H *et al.* 2006a How to improve IVF–ICSI outcome by sperm injection? *Reproductive BioMedicine Online* 12, 634–638.
- Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A *et al.* 2006b Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Human Reproduction* 21, 1787–1790.
- Berkovitz A, Eltes F, Yaari S *et al.* 2005 The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Human Reproduction* 20, 185–190.
- Carrell D 2008 Symposium: Genetic and epigenetic aspects of assisted reproduction. Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness. *Reproductive BioMedicine Online* 16, 474–484.
- Casuso NG, Plouchart JM, Balet R *et al.* 2007 Interest of a new morphological classification of human spermatozoa for ICSI allowing to obtain a better blastocyst score. *Human Reproduction* 22 (Suppl. 1), i113.
- Fernandez-Gonzalez R, Nuno Moreira P, Perez-Crespo M *et al.* 2008 Long term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of Reproduction* 78, 761–772.
- Franco Jr JG, Baruffi RLR, Mauri AL *et al.* 2008 Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 17, 42–45.
- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M *et al.* 2008 High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reproductive BioMedicine Online*, in press.
- Gopalkrishnan K, Padwal V, Meherji PK *et al.* 2000 Poor quality of sperm as it affects repeated early pregnancy loss. *Archives of Andrology* 45, 111–117.
- Hammadeh M, Nkemayim D, Georg T *et al.* 2000 Sperm morphology and chromatin condensation before and after semen processing. *Archives of Andrology* 44, 221–226.
- Hazout A, Dumont-Hassant M, Junca AM *et al.* 2006 High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 12, 19–25.
- Jones G, Trounson A, Lolaitis N *et al.* 1998 Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility* 70, 1022–1029.
- Junca AM, Cohen-Bacrie P, Hazout A 2004 Improvement of fertilisation and pregnancy rate after intracytoplasmic fine morphology selected sperm injection. *Fertility and Sterility* 82 (Suppl. 2), S173.
- Krawetz S 2005 Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nature Reviews Genetics* 6, 633–642.
- Larson K, DeJonge C, Barnes A *et al.* 2000 Relationship of assisted reproductive technique (ART) outcomes with sperm chromatin integrity and maturity as measured by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Human Reproduction* 15, 1717–1722.
- Liu D, Baker H 2007 Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Human Reproduction* 22, 1597–1602.
- Ménézo Y, Hazout A, Panteix G *et al.* 2007 Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reproductive BioMedicine Online* 14, 418–421.
- Miller JE, Smith TT 2001 The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Human Reproduction* 16, 918–924.
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL *et al.* 2006 Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 85, 371–383.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S *et al.* 2005 Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 11, 198–205.
- Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM *et al.* 2006 In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *New England Journal of Medicine* 354, 1139–1146.
- Sakkas D, Umer F, Bizzaro D *et al.* 1998 Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction* 13, 11–19.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB *et al.* 2004 Extent of nuclear damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 82, 378–383.
- Shoukir Y, Chardonnes D, Campana A *et al.* 1998 Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence. *Human Reproduction* 13, 1632–1637.
- Tesarik J 2005 Paternal effects on cell division in the preimplantation embryo. *Reproductive BioMedicine Online* 10, 370–375.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C 2004 Late but not early paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction* 19, 611–615.
- Thundathil J, Palasz A, Barth A *et al.* 1998 Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing

Article - Effect of sperm selection on blastocyst development - P Vanderzwalmen *et al.*

- multiple vacuoles. *Molecular Reproduction and Development* **50**, 328–333.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B *et al.* 1996 Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolemma. *Human Reproduction* **11**, 540–547.
- Vanderzwalmen P, Bertin-Segal G, Geerts L *et al.* 1991 Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Human Reproduction* **6**, 581–588.
- Vitro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP 2004 Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* **81**, 1289–1295.
- Zech NH, Lejeune B, Puissant F *et al.* 2007 Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertility and Sterility* **88**, 244–246.
- Zech I, Vanderzwalmen P, Zech N 2002 Entwicklung von Embryonen nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) bei 'non-male factor' Infertilität in Relation zur Injektionstechnik. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* **12**, 13–18.

Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

Received 2 May 2008; refereed 12 June 2008; accepted 16 July 2008.

Příloha č. 3.

Uher, P., Baborová, P., Hüttelova, R., Králíčková, 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, roč.
152, č. 2, s. 231-233.

METHODOLOGICAL ASPECTS OF ATTEMPTS TO TRANS-DIFFERENTIATE ADULT STEM CELLS INTO EMBRYONIC-LIKE CELLS *IN VITRO*.

Petr Uher^a, Petra Baborova^a, Renata Huttelova^a, Milena Kralickova^{a,b*},
 Pierre Vanderzwalmen^c, Nicolas Zech^c

^a Institute of Reproductive Medicine and Endocrinology, B. Smetany 2, 30177 Pilsen, Czech Republic

^b Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University in Prague, Karlovarská 48, Plzeň, Czech Republic, CZ-301 66;

^c Centre Hospitalier Inter Regional Cavell (CHIREC), Braine l'alleud, Brussels, Belgium.
 e-mail: M.Kralickova@seznam.cz

Received: April 18, 2008; Accepted: May 10, 2008

Key words: Haematopoietic stem cells/Mouse embryonic stem cells/Trans-differentiation/ Regenerative medicine

Aims: The aim of this research was to set up an *in vitro* system to trans-differentiate haematopoietic stem cells (HSCs) into embryo-like stem cells in order to de-differentiate them. In this more naive state they should be cultivated more easily in order to augment them for consecutive differentiation and autologous transplantation for use in clinical practice.

Methods: Using the principle of the methodology of blastocyst injection, HSCs were co-cultivated with mouse embryonic stem cells (mES) with and without cell to cell contact. After co-cultivation HSCs were analyzed by flow-cytometry using haematopoietic markers (CD34, CD45, CD133) and embryonic stem cell markers (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81).

Results: No ES cell markers were detected on the former HSCs. A decrease in HSC marker intensity was the only finding. This implies that no de-differentiation took place.

Conclusions: We hypothesize that the unnatural situation of a mixture of two cell types originating in different species may have led to this outcome. To achieve our goal of *in vitro* de-differentiation we need to use a purely human culture system without animal additives.

INTRODUCTION

Each new finding on stem cells raises hopes for their use in the clinical fields of regenerative medicine and transplantations. A few years ago, the finding of the trans-differentiation phenomenon was a major step forward in stem cell research¹⁻⁸. This is the ability of tissue-specific stem cells to acquire the character of cell types different from the tissue of origin, regardless of germ layer origin. However, it is not definitely confirmed, whether there is true trans-differentiation *in vivo* or cell fusion, and what kind of biological relevance these phenomena have. It remains however, that trans-differentiation is a basic notion underlying the potential use of stem cells in the clinical field.

One interesting aspect of trans-differentiation is the possibility of influencing stem cells to become more naive, that is - to be "de-differentiated". De-differentiation occurs *in vivo* and *in vitro*. An indication for the capacity of adult stem cells to trans-/de-differentiate into an embryo-like state is seen in the model of blastocyst injection, where adult stem cells are injected into mouse blastocysts⁹. These cells take part in the development of the mouse. In such a chimeric mouse, derivatives of the former adult stem cells were found in several different tissues. This finding indicates that the adult stem cells must have been incorporated into the inner cell mass (ICM)

of the blastocyst and de-differentiated as derivatives of the injected adult stem cells are not exclusively found in the tissue of origin. Injected cells have also been found in the epithelium of the gastrointestinal tract, the skin, the brain and other organs^{10, 11}. These experiments suggest that adult cells could become naive (embryo-like) in an embryonic surrounding.

The aim of the present experiments was to set up an *in vitro* system to trans-differentiate easily-accessible adult stem cells, haematopoietic stem cells (HSCs) from umbilical cord blood (UCB) into embryo-like stem cells and to establish a pool of cells for transplantation. In this more naive state it should be easier to cultivate and to increase them (because of their regained renewal potential, comparable with embryonic stem cells) for consecutive differentiation and autologous transplantation. Such de-differentiated cells could also be a tool for investigating embryonic-like human stem cells without ethical or moral concerns.

MATERIALS AND METHODS

Purification of umbilical cord blood stem cells.

It has been shown that HSCs are highly enriched in the population of CD34⁺ cells^{2, 12-14}. For this reason we determine CD34⁺ cells as HSCs. Sodium citrate was added

as an anticoagulant to the UCB. HSCs were then enriched by Ficoll density gradient purification^{15, 16} followed by an immunomagnetic selection (Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Midi-MACS System, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for CD34⁺ cells. Their purity was determined by flow-cytometry.

Flow-cytometry analysis of CD34⁺ cells.

Flow-cytometry was performed on a FACSCalibur system (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) and analysed with CELLQuestPro software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Approximately 3x10⁴ cells were acquired from each sample. Forward- and side-scatter plots were used to exclude dead cells and debris from the analysis after staining cells with 5µl/ml of propidium iodide (PI). Necrosis correlates with a small decrease in forward scatter and in increase in side scatter of the PI-positive population whereas apoptosis is associated with a decrease in both forward scatter and side scatter of the PI-positive population. Dot plot analysis was used to estimate HSC purity and histogram analysis for estimating de-differentiation events. The following antibodies were applied for sorting HSCs: CD133/2-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD34-PerCP-CY5.5 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), and CD45-FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Only fractions with >90% CD34⁺ were used for further experiments.

To check de-differentiation, the embryonic stem cell markers SSEA-4 (Chemicon, Temecula, CA), Tra-1-60 (Chemicon, Temecula, CA) and Tra-1-81 (Chemicon, Temecula, CA) were used, each linked with anti-mouse-biotin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) and streptavidin-APC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Adequate negative isotype controls were used in the experiments.

Co-culture system.

For co-cultivation Transwell® System (Corning, NY, USA) for a 6-well tissue culture plate was used. Different cell types are cultured in this system - grown in the same medium but separated by a membrane (0.4 µm pore), permeable only to soluble molecules.

Experiment 1: Mouse embryonic stem cells (mES) (mES Sv129 provided by Dr. L. Schoonjans, KU Leuven, Belgium) were grown on feeder cells, mitotic inactivated mouse fibroblasts (MEF) in the lower compartment and HSCs [1x10⁵/ml] were cultured in the upper compartment. As control feeders without mES were grown in the lower compartment, the upper compartment was seeded with HSCs.

Experiment 2: Murine ES were replated before co-cultured with HSCs.

Experiment 3: To allow cell to cell contact, the membrane was directly positioned on the mES. The mES cells were plated on gelatinised wells.

In all experiments the TX-WES medium (ThrombX,

Leuven, Belgium) charged with FCS (foetal calf serum) (10%) and L-Glutamine (2 mM) was used.

Immunocytochemistry.

To check the differentiation status of mES, the cells were stained against alkaline phosphatase (AP) (Alkaline Phosphatase Substrat Kit III, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), cytokeratin (EPOSTM Anti-human Cytokeratin/HRP; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) and vimentin (EPOSTM Anti-Vimentin/HRP; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Mouse ES cells were fixed with paraformaldehyde (1%) and then rinsed. According to the protocol recommended by the company, cells were stained with AP. After checking for the presence of AP, cells were stained for cytokeratin and vimentin. The fixed cells were blocked with mouse serum and then incubated with cytokeratin/HRP (1:10) and vimentin/HRP (1:10). After incubation the cells were rinsed and admixed with peroxidase substrate diaminobenzidine (DAB).

RESULTS AND DISCUSSION

The aim of the experiments was to set up an *in vitro* system to de-differentiate adult HSCs into embryonic like cells. Inspired by the generation of chimeras using blastocyst injection, the HSCs were co-cultivated with embryonic stem cells with and without cell to cell contact.

In the first experiment, co-cultivation of MEFs, mES cells and HSCs took place. With this experiment it was not possible to detect ES cell markers. Only the intensity of the HSC cell marker decreased. CD45 is more strongly expressed in HSCs than CD34 and CD133 and it was also the most stable marker. The intensity of CD34 and CD133 dropped more rapidly. No differences were seen whether co-cultivation was carried out with or without mES cells. Therefore it was reasonable to leave MEFs out of the co-culture, as the feeder cells may cover the effect of the mES cells.

In experiment 2, mES were replated and their differentiation status was checked by staining against AP, cytokeratin and vimentin. The collagen matrix of the MEFs should support the growth of the mES without the influence of the soluble factors released by MEFs. Murine ES do not retain their embryonic status without MEFs for long. Therefore fresh replating had to be carried out once every day. The insert with the HSCs was placed every day into a fresh replated well. No ES cell markers were detected on the former HSCs, only a decrease of the HSCs marker intensity was noticed.

In recent years a series of reports¹⁷⁻²¹ have been published suggesting that trans-differentiation in co-culture experiments often needs a cell to cell contact between the different cell types. To take care of this, in the third experiment the cell to cell contact of mES and HSCs was allowed, MEFs were avoided. As in the previous experiments, only a decrease of the HSCs marker intensity was detected. Thus, in our setting, the cell to cell contact did

not support the de-differentiation of the cells. Of note was the fact that mES differentiated faster when they were in direct contact with the membrane.

We hypothesize that the failure of our de-differentiation strategies is caused by the fact that the cells derived from different species. In the experiments two sorts of stem cells were used and each of them requires completely different environment for the maintenance in fundamental stage – the mESc need leukemia inhibitory factor (LIF) and HSCs need activin/nodal molecules^{22, 23}. To reach our goal of *in vitro* de-differentiation we will need to change our strategy towards a pure human culture system without any animal additives.

LIST OF ABBREVIATIONS

FCS – foetal calf serum
 HSCs – haematopoietic stem cells
 ICM – inner cell mass
 LIF – leukemia inhibitory factor
 MEFs – mitotic inactivated mouse fibroblasts
 mES cells – mouse embryonic stem cells
 hES cells – human embryonic stem cell
 UCB – umbilical cord blood

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, Grant No. 301/05/0078 and by Internal Grant Agency of Ministry of Health IGA MZD NR/ 9135-3. The authors would like to thank the team of Eccocell, A-8036 Graz, Austria, for providing cord blood and to thank Luc Schoonjans, Thromb-X, NV, C/O Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Leuven, Belgium for his technical assistance.

REFERENCES

- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.
- Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:5320-5325.
- Grompe M. Pancreatic-hepatic switches *in vivo*. *Mech Dev* 2003; 120:99-106.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-705.
- Shen CN, Horb ME, Slack JM, Tosh D. Transdifferentiation of pancreas to liver. *Mech Dev* 2003; 120:107-116.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999; 283:534-537.
- Austin TW, Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 2003; 120:131-135.
- Karbanová J, Mokry J, Kotingová L. Neural stem cells transplanted into intact brains as neurospheres form solid grafts composed of neurons, astrocytes and oligodendrocyte precursors. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2004; 148:217-220.
- Harder F, Henschler R, Junghahn I, Lamers MC, Muller AM. Human hematopoiesis in murine embryos after injecting human cord blood-derived hematopoietic stem cells into murine blastocysts. *Blood* 2002; 99:719-721.
- Geiger H, Sick S, Bonifer C, Muller AM. Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell* 1998; 93:1055-1065.
- Gardner RL. Contributions of blastocyst micromanipulation to the study of mammalian development. *Bioessays* 1998; 20:168-180.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:2804-2808.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34^{low}/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273:242-245.
- Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996; 88:3731-3740.
- Gabbianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, Testa U, Isacchi G, Peschle C. "Pure" human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1990; 249:1561-1564.
- Thoma SJ, Lamping CP, Ziegler BL. Phenotype analysis of hematopoietic CD34⁺ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood* 1994; 83: 2103-2114.
- Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000; 3:986-991.
- Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107:1024-1032.
- Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004; 430:350-356.
- 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; 118:450-460.
- Ball SG, Shuttleworth AC, Kiely CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:714-727.
- Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch WM, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22:770-778.
- 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; 55:169-180.

Příloha č. 4.

Uher, P., Hüttelová, R., Králíčková, M., Novotný, Z., Rokyta, Z.,
Vanderzwalmen, P.

Jak dediferencovat hematopoetické kmenové buňky z umbilikální krve *in vitro*? Naše první výsledky s použitím kokultivačních systémů.

Česká gynekologie, 2007, roč. 72, č. 4, s. 280-283.

Jak dediferencovat hematopoetické kmenové buňky z umbilikální krve in vitro? Naše první výsledky s použitím kokultivačních systémů

Čes. Gynek.
72, 2007, č. 4
s. 280-283

How Can the Haematopoietic Stem Cells from the Umbilical Cord Blood be De-Differentiated in vitro? Our First Results Using the Co-Cultivation Systems

Uher P.^{1,2}, Hüttelová R.¹, Králíčková M.^{1,2}, Novotný Z.², Rokyta Z.², Vanderzwalmen P.³

¹Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, Plzeň, vedoucí lékař MUDr. P. Uher

²Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN, Plzeň, přednosta doc. MUDr. Z. Rokyta, CSc.

³Centre Hospitalier Inter Regional Cavell (CHIREC), Braine l'Alleud, Brusel, Belgie.

Abstract

Objective: Aim of this study was to de-differentiate the haematopoietic stem cells (HSCs) that originated from the umbilical cord blood. One of the ways to do it is to use a co-cultivation system.

Design: Prospective experimental study.

Setting: Laboratory study - Institute of reproductive medicine and endocrinology, Pilsen.

Methods: HSCs were co-cultivated with mouse embryonic stem cells (mESC) with and without feeder cells. After co-cultivation HSCs were analyzed using flow-cytometry for presence of haematopoietic markers (CD34, CD45, CD133) and using immunohistochemistry for presence of embryonic stem cell markers (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81).

Results: No de-differentiation was detectable in any our experiment, only the intensity of the HSC cell markers decreased.

Conclusion: We suppose that there were two major reasons for the experiment failure: there was no direct cell to cell contact and there was a mixture of cell types that originated from two different species. To reach our goal of in vitro de-differentiation we will need to change our strategy towards a pure human culture system without any animal additives and with cell to cell contact.

Key words: haematopoietic stem cells (HSCs), mouse embryonic stem cells (mESC), umbilical cord blood (UCB), flow cytometry (FACS), immunohistochemistry

Souhrn

Cíl studie: Cílem naší práce bylo za pomoci kokultivace dediferencovat lidské hematopoetické kmenové buňky (HKB), které jsme izolovali z pupečnickové krve.

Typ studie: Prospektivní experimentální studie.

Název a sídlo pracoviště: Laboratoře Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie, Plzeň.

Metodika: HKB byly kokultivovány s myšími embryonálními kmenovými buňkami (mEKB), a to jak za přítomnosti podpůrných buněk, tak bez nich. HKB byly po kokultivaci analyzovány jednak pomocí průtokového cytometru na přítomnost hematopoetických markerů (CD34, CD45, CD133) a jednak pomocí imunohistochemie na přítomnost markerů dediferenciace (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81).

Výsledky: Ani jedna forma kokultivace s mEKB k dediferenciaci HKB nevedla. Jedinou změnou ve fenotypu HKB buněk byl pokles intenzity hematopoetických markerů.

Závěr: Domníváme se, že k dediferenciaci nedošlo ze dvou důvodů: nebyl umožněn přímý kontakt buněk a kokultivovány byly buňky dvou různých živočišných druhů. Naším cílem je pokračovat v pokusech dediferencovat dospělé kmenové buňky pomocí kokultivačních systémů za použití buněk stejného živočišného druhu a přímého kontaktu buněk.

Klíčová slova: hematopoetické kmenové buňky (HKB), myší embryonální kmenové buňky (mEKB), pupečnicková krev, průtoková cytometrie, imunohistochemie

ÚVOD

Multipotentní dospělé kmenové buňky (DKB) se účastní regenerace a hojení tkání. Totipotentní embryonální kmenové buňky (EKB) jsou schopny vytvářet tkáň a orgány, a to díky několika svým charakteristickým vlastnostem – po mnoho pokolení (měsíce až roky) se dobře dělí, jsou bez specializace a mohou být indukovány tak, aby se diferencovaly v jakémkoliv směru, do jakýchkoliv specializovaných buněk. Kromě těchto známých vlastností byla v poslední době objevena jejich schopnost „reprogramovat“ DKB *in vitro*, které po té vykazují charakteristiky pluripotentních buněk: exprimují markery pluripotence (např. Oct-4, nanog či Rex-1), reaktivují inaktivní chromozom X ženských somatických buněk a objevuje se demethylace DNA [8, 10, 21, 26].

V *in vivo* podmínkách byla trans- či dediferenciace tkáňově specifických DKB též prokázána, je to ale proces relativně neefektivní, který není příliš častý ani při poškození tkání, takže vlastně nadále zůstává otázkou, zda vůbec je tento proces *in vivo* relevantní [5].

Pochopení trans- a dediferenciace a její uskutečnění *in vitro* by mělo široké praktické použití. Např. v experimentální terapii infarktu myokardu se osvědčily kardiomyocyty derivované z lidských EKB, které jsou schopné regenerovat tkáň i zlepšit srdeční funkce, ale problémem zůstává imunologická bariéra. Řešením se tedy zdá v současnosti testovaná dediferenciace autologních DKB, které by byly reprogramovány k multipotenci díky kokultivaci s lidskými EKB [12, 23].

K dediferenciaci se kromě kokultivačních technik používají i jiné metody - enukleace EKB a jejich následná fúze s DKB, permeabilizace buněčných membrán DKB následovaná opět buněčnou fúzí či použitím některých cytokinů a růstových faktorů [12, 27].

Zatím pouze několik typů DKB prokázalo určitou schopnost dediferenciace, a navíc může být snadno a minimálně invazivně získáváno z těl pacientů. Mezi takové buňky patří hematopoetické buňky získávané z pupečnickové krve.

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.

MATERIÁL A METODIKY

Purifikace HKB z pupečnickové krve

HKB jsou charakterizovány přítomností markeru CD34 [2, 22, 24]. Jejich selekce byla provedena imunomagneticky pomocí isolačního kitu (Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Midi-MACS System, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) [11, 28].

Detekce CD34⁺ buněk průtokovou cytometrií

Průtoková cytometrie byla prováděna na systému FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) a analyzována pomocí softwaru CELLQuestPro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Z každého vzorku pupečnickové krve bylo získáno přibližně 3×10^4 buněk. Mrtvé buňky a debris byly analýzou vyřazeny. Kontrola homogenity CD34⁺ buněčné populace byla prováděna pomocí následujících protilátek: CD133/2-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD34-PerCP-CY5.5 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) a CD45-FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Pouze ty vzorky, které obsahovaly více než 90 % CD34⁺ buněk byly použity pro další experimenty.

K detekci dediferenciace byly použity následující markery pluripotence: SSEA-4 (Chemicon, Temecula, CA), Tra-1-60 (Chemicon, Temecula, CA) a Tra-1-81 (Chemicon, Temecula, CA). K vizualizaci markerů jsme použili anti-myší biotin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) a streptavidin-APC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Kokultivační systém

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, University of Leuven, Belgie) byly pěstovány na podpůrných buňkách, kterými byly mitoticky inaktivované myší fibroblasty (MIMF). To bylo uloženo v dolním kompartmentu. Lidské HKB [$1 \times 10^5/\text{ml}$] byly kultivovány v horním kompartmentu. Jako kontrola byly pěstovány podpůrné buňky bez mEKB v dolním kompartmentu, s HKM umístěnými v horním kompartmentu.

Experiment č. 2: Myší EKB byly pěstovány bez podpůrných buněk. Stav jejich diferenciaci byl ověřen kontrolní detekcí AP, cytokeratinu a vimentinu. Protože myší EKB nejsou bez podpůrných buněk dlouhodobě stabilní, byly do dolního kompartmentu každý den dány čerstvé. Lidské HKB [$1 \times 10^5/\text{ml}$] byly kultivovány v horním kompartmentu.

V obou experimentech bylo použito TX-WES médium (ThrombX, Leuven, Belgie) doplněné 10% fetálním telecím sérem (FTS) a 2 mol/L L-Glutaminem.

Imunocytochemie

Kontrola diferenciaci myších EKB byla prováděna imunohistochemicky – buňky byly zkoumány na přítomnost alkalické fosfatázy (AP) (Alkaline Phosphatase Substrat Kit III, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), cytokeratinu (EPOSTM Anti-human Cytokeratin/HRP; DakoCytomation, Glostrup, Dánsko) a vimentinu (EPOSTM Anti-Vimentin/HRP; DakoCytomation, Glostrup, Dánsko). Myší EKB byly fixovány

1 % paraformaldehydem. Detekce AP byla prováděna dle firemního protokolu. Po té byla prováděna detekce cytokeratinu a vimentinu. Fixované buňky byly inkubované s cytokeratinem/HRP (1:10) a vimentinem/HRP (1:10). Po inkubaci byly buňky opláchnuty a byl použit běžný DAB systém (peroxidase substrate diaminobenzidine).

VÝSLEDKY

V experimentu č. 1 byla prováděna kokultivace mEKB + MIMF a HKB. 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 podpůrné buňky možná překrývají vliv mEKB, a v pokusu č. 2 jsme je tedy vyřadili.

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

DISKUSE

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 [3, 4, 18, 20, 25, 32].

Hlavní problém ale bude pravděpodobně tkvět v tom, že byly použity buňky od různých živočišných druhů. To vede jednak k technickým komplikacím a jednak k ne zcela přirozenému prostředí pro oba typy buněk. Příkladem je nemožnost použití myšního leukemického inhibičního faktoru (LIF) v systému. Ačkoliv by LIF zachoval dediferenciaci myšských EKB, pro lidské HKB je zcela nevhodný. Podobně je tomu tak s použitým médiem, TX-WES, které je optimální pro mEKB, ale není nejlepší volbou pro HKB. Z toho tedy jasně vyplývá, že největší šanci na úspěch dediferenciace budou mít kokultivační systémy založené na komponentech pocházejících z jednoho živočišného druhu.

Ačkoliv mEKB a lidské EKB jsou obojí savčí, mají celou řadu rozdílných vlastností – reagují jinak na cytokiny, růstové faktory, exprimují různé geny apod. [15]. První linie mEKB byla popsána v roce 1981 [9, 17] a trvalo dalších téměř 20 let, než se podařilo publikovat derivaci první linie lidských EKB [29]. Od té doby se tyto dva světy neustále setkávají, lidské EKB jsou v mnoha publikacích pěstovány na podpůrných buňkách myšského původu apod. Takové uspořádání je však nepo-

užitelné pro humánní medicínu [16, 19]. Aby bylo možné lidské EKB použít, je nutno je pěstovat co možná nejbezpečněji. Z toho důvodu byly podpůrné buňky zvířecího původu nahrazeny lidskými buňkami, např. fibroblasty [13] anebo vypuštěny úplně [14]. Dalším důležitým krokem je úprava médií, a to tak, aby obsahovala pouze proteiny lidského původu či ještě lépe syntetické, přesně definované růstové faktory. Mechanicky (ne enzymaticky) prováděná izolace embryoblastu i pasážování kolonií je dalším krokem k zvýšení bezpečného používání linií [27].

K objevu media, jež bude „čistě“, složené jen ze syntetických růstových faktorů přesně definovaných koncentrací, přispívá studium různých regulačních molekul. Jedním z cytokinů, který reguluje pluripotenci a spontánní diferenciaci EKB a jehož mechanismy působení (ačkoliv je o nich již sepsáno na stovky prací) ještě nejsou zcela pochopeny, je leukemický inhibiční faktor (LIF).

Zatímco u mEKB je funkce LIF zřejmá – jeho přítomnost v médiu zachovává linii v nediferencovaném stavu a aktivace STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3) skrze receptor pro LIF (LIF-R) se zdá dostačující pro zachování pluripotenci, u lidských EKB je situace daleko složitější. Bylo prokázáno, že LIFR-beta a gp130 (další součást LIF-R) jsou exprimované na lidských EKB a také že LIF může indukovat fosforylaci STAT3. I přesto však LIF sám o sobě není schopen pluripotenci lidských EKB udržet [7]. Expres LIF i LIF-R (jak mRNA, tak proteinu) byla prokázána na spontánně se diferencujících lidských EKB. Tato exprese je signifikantně větší než u nediferencovaných buněk, které hojně exprimují SOCS-1 (supresor cytokinové signalizace-1). Ani suplementace LIFu do média nezastavila spontánní diferenciaci buněk [1].

Navíc LIF reguluje expresi celé řady dalších významných molekul, např. CD 44 a lamininu A, které hrají významnou roli v diferenciaci lidských EKB [6, 30, 31].

ZÁVĚR

Pochopení mechanismů pluripotenci, diferenciaci a dediferenciace jistě přispěje k budoucímu terapeutickému použití EKB i DKB v tkáňové terapii.

Poděkování: Autoři děkují dr. Lucovi Schoonjansovi z Centra pro molekulární a vaskulární biologii z University of Leuven v Belgii za jeho obětavou pomoc a podporu v průběhu celého projektu.

LITERATURA

1. Aghajanova, L., Skottman, H., Stromberg, AM., et al. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptors is increased during differentiation of human embryonic stem cells. *Fertil Steril*, 2006, 86, suppl 4, p. 1193-1209.

2. **Baum, CM., Weissmann IL., Tsukamoto, S., et al.** Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci, USA.*, 1992, 89, 7, p. 2804-2808.
3. **Badorf, C., Brandes, RP., Popp, R., et al.** Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, 2003, 107, 7, p. 1024-1032.
4. **Ball, SG., Shuttleworth, AC., Kielty, CM.** Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36, 4, p. 714-727.
5. **Bunting, KD., Hawley, RG.** Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells. *Biol Cell*, 2003, 95, 9, p. 563-578.
6. **Choi, CH., Roh, CR., Kim, TJ., et al.** Expression of CD44 adhesion molecules on human placenta. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006, 128, 1-2, p. 243-247.
7. **Daheron, L., Opitz, SL., Zaehres, H., et al.** LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2004, 22, 5, p. 770-778.
8. **Do, JT., Scholer, HR.** Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 2006, 60, p. 35-45.
9. **Evans, MJ., Kaufman, MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292, 5819, p. 154-156.
10. **Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., et al.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998, 279, 5356, p. 1528-1530.
11. **Gabbianelli, M., Sargiacomo, M., Pelosi, E., et al.** "Pure" human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science*, 1990, 249, 4976, p. 1561-1564.
12. **Heng, BC., Haider, HK., Sim, EK., et al.** Comments about possible use of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes to direct autologous adult stem cells into the cardiomyogenic lineage. *Acta Cardiol*, 2005, 60, 1, p. 7-12.
13. **Inzunza, J., Gertow, K., Stromberg, MA., et al.** Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*, 2005, 23, 4, p. 544-549.
14. **Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., et al.** Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet*, 2005, 365, p. 1636-1641.
15. **Koestenbauer, S., Zech, NH., Juch, H., et al.** Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am J Reprod Immunol*, 2006, 55, 3, p. 169-180.
16. **Koryntová, D., Jelínková, L., Řežábek, K., et al.** Asistovaná reprodukce - současný stav a perspektivy. *Čes Gynek*, 1999, 64, 6, s. 383-388.
17. **Martin, GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78, 12, p. 7634-7638.
18. **Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, BL.** Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 1992, 70, 5, p. 841-847.
19. **Mikkola, M., Olsson, C., Palgi, J., et al.** Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. *BMC Dev Biol*, 2006, 6, p. 40-41.
20. **Mollah, ZU., Aiba, S., Manome, H., et al.** Cord blood CD34+ cells differentiate into dermal dendritic cells in co-culture with cutaneous fibroblasts or stromal cells. *J Invest Dermatol*, 2002, 118, 3, p. 450-460.
21. **Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., et al.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410, 6829, p. 701-705.
22. **Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., et al.** Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 1996, 273, 5272, p. 242-245.
23. **Pessina, A., Gribaldo, L.** The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives. *Curr Med Res Opin*, 2006, 22, 11, p. 2287-2300.
24. **Pflumio, F., Izac, B., Katz, A., et al.** Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood*, 1996, 88, 10, p. 3731-3740.
25. **Shamblott, MJ., Axelman, J., Wang, S., et al.** Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 23, p. 13726-13731.
26. **Shen, CN., Horb, ME., Slack, JM., et al.** Transdifferentiation of pancreas to liver. *Mech Dev*, 2003, 120, 1, p. 107-116.
27. **Skottman, H., Dilber, MS., Hovatta, O.** The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines. *FEBS Lett*, 2006, 580, 12, p. 2875-2878.
28. **Thoma, SJ., Lamping, CP., Ziegler, BL.** Phenotype analysis of hematopoietic CD34+ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood*, 1994, 83, 8, p. 2103-2114.
29. **Thomson, JA., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, SS., et al.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282, 5391, p. 1145-1147.
30. **Wright, LS., Li, J., Caldwell, MA., et al.** Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem*, 2003, 86, 1, p. 179-195.
31. **Xiao, L., Yuan, X., Sharkis, SJ.** Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24, 6, p. 1476-1486.
32. **Wurmser, AE., Nakashima, K., Summers, RG., et al.** Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*, 2004, 430, 6997, p. 350-356.

MUDr. Petr Uher

Institut reprodukční medicíny a endokrinologie
B. Smetany 2
30177 Plzeň

Příloha č. 5.

Králíčková, M., Šíma, R., Vaněček, T., Šíma, P., Rokyta, Z., Ulčová-
Gallová, Z., Suchá, R., **Uher, P.**, Hes, O.

Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile
women are not restricted to nulligravid patients.

Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol., 2006, roč. 127, č. 2, s. 231-235.

IF= 0,955, citováno 8x.

Available online at www.sciencedirect.comEuropean Journal of Obstetrics & Gynecology and
Reproductive Biology 127 (2006) 231–235www.elsevier.com/locate/ejogrb

Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients

Milena Kralickova^{a,*}, Radek Sima^b, Tomas Vanecek^b, Petr Sima^c, Zdenek Rokyta^a,
Zdenka Ulcova-Gallova^a, Renata Sucha^{a,d}, Petr Uher^{a,d}, Ondrej Hes^b

^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, Faculty of Medicine, Charles University,
Capkovo namesti 1, Plzen CZ-326 00, Czech Republic

^bDepartment of Pathology, University Hospital, Faculty of Medicine, Charles University, Alej Svobody 80, Plzen CZ-301 66, Czech Republic

^cDepartment of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, Prague CZ-142 20, Czech Republic

^dInstitute of Reproductive Medicine and Endocrinology, University Hospital, Faculty of Medicine, Charles University,
B. Smetany 2, Plzen CZ-301 77, Czech Republic

Received 20 February 2005; received in revised form 22 January 2006; accepted 13 February 2006

Abstract

Objective: Leukemia inhibitory factor (LIF) is one of the key cytokines in the embryo implantation regulation. We investigated the prevalence of the LIF gene mutations in the population of infertile women that consisted of nulligravid and secondary infertile patients. **Study design:** We designed a LIF gene mutation screening method that is based on the Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE). The population to screen consisted of 176 infertile women including group A of 147 nulligravid women and group B of 29 women with secondary infertility that had a history of either miscarriage or an ectopic pregnancy but no live births. The control population was comprised of 75 healthy fertile subjects. The groups of fertile controls and infertile patients were compared for statistically significant differences using the *t*-test.

Results: Six potentially functional LIF gene mutations, the G to A transitions at the position 3400 leading to the valin to methionin exchange at codon 64 (V64M) in the AB loop region of the LIF protein, were detected. All of the six positive women were infertile. Four of them were nulligravid and two of them had history of spontaneous conception followed by early miscarriage. No positive TGGE samples were identified in the control group, which means that the frequency of functionally relevant mutations of the LIF gene in infertile women is significantly enhanced in comparison with controls ($P < 0.05$, *t*-test).

Conclusion: The results suggest that the LIF gene mutations affect fertility. Even though they occur infrequently, their impact on molecular events during early phases of pregnancy should be further established.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Leukemia inhibitory factor (LIF); Mutations; Embryo implantation; Infertility

1. Introduction

The process of the embryo implantation can be divided into three phases: apposition, adhesion, and invasion. The apposition comprises the blastocyst orientation in the uterine cavity towards the endometrium. During the adhesive and invasive phases, the blastocyst approaches the epithelium,

attaches itself to it and the embryonic trophoblast invades the decidua. All these steps are controlled by a variety of mutually interacting molecules of both the maternal and the embryonic origin [1,2]. Many cytokines, growth factors, transforming growth factors, and adhesive molecules are known to trigger the initial process for the embryo nidation during the adhesive phase and accomplish mutual embryo–maternal contacts during the invasive phase [1,3–5]. Accumulated evidence suggests that cytokine signalling produced and received by the endometrial epithelium and the blastocyst represents a key event in the embryo–maternal crosstalk [3,6]. The leukemia

* Corresponding author. Tel.: +42 377 617 229; fax: +42 377 617 290; mobile: +42 604 724 171.

E-mail address: M.Kralickova@seznam.cz (M. Kralickova).

inhibitory factor (LIF) is regarded as one of the most important signalling vectors [7–12].

LIF is a polyfunctional highly glycosylated cytokine (a glycoprotein, M_w 38–67 kDa) that influences a wide range of cell types in different ways, from the promotion of cell proliferation and lifespan, to the control of their differentiation in regard to the tissue environment in which the target cells perform their functions [13,14].

LIF mature protein of maternal origin and its encoding mRNA have been identified in endometrium, Fallopian tubes, and cervical mucus [15–18]. Its high endometrial production in the mid and late phase of the menstrual cycle stresses its important role in the implantation [17,19]. Simultaneously, the blastocyst expresses the mRNA for LIF receptor (LIF-R), which documents the significance of LIF in the embryo–maternal crosstalk [20]. LIF receptor is also expressed on the endometrium and oocytes. Binding of LIF to LIF receptor and gp130 activates signal transduction pathways.

LIF can be detected in uterine flushing and its production is in the majority of women with unexplained infertility significantly deregulated [21]. Likewise, endometrial explants derived from infertile women showed reduced levels of LIF secretion [21–24].

Targeted disruption of LIF gene in female mice caused the implantation failure of blastocyst. However, these blastocysts transferred to wild-type pseudopregnant recipients implanted successfully and developed to term [7,8].

Human LIF protein is encoded by the unique gene located in the 22q12 region of the 22nd chromosome. Its coding sequence, as well as some parts of the non-coding sequences, is highly conserved. The coding region consists of three exons, the promoter region comprises of four conserved TATA boxes and two transcription-starting sites [25–27]. Until now, only two reports have been dedicated to the identification of LIF gene mutations in infertile women [28,29]. Both studies conclude that heterozygosity for LIF gene mutations leading either to decreased availability or

specific biological activity of the LIF protein could act as genetic predisposition of infertility due to its impact on efficacy of embryo implantation. Nevertheless, the significance of LIF gene alterations, their prevalence, functional consequences, and clinical impacts are still not fully understood. Therefore, in this study a control group of fertile women and a group of nulligravid and secondary infertile women have been screened for the presence of LIF gene mutations.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The population to screen consisted of 176 infertile women of mean age 31 ± 4 years. The population was at first divided according to type of infertility (nulligravid women = primary infertility [=group A] or secondary infertility [=group B]). The group A was divided according to assumed cause of infertility (ovulatory disorder, tubal blockage, endometriosis, male subfertility, idiopathic infertility). A group of nulligravid patients comprised of 57 women diagnosed with primary idiopathic infertility and a history of at least one IVF or ICSI treatment failure (average 1.8 embryo transfer per patient) and of 90 women with primary infertility with known etiology. The subgroup B comprised of 29 women diagnosed with secondary infertility with history of a miscarriage or an ectopic pregnancy after spontaneous conception but no live births (Table 1).

The control population comprised of 75 healthy fertile women that conceived spontaneously and delivered successfully at least once in their history. The group had similar mean age (34 ± 6 years).

The study was approved by the Charles University Ethics Committee and informed consent was obtained from all individuals.

Table 1
Patients and controls

Type of infertility	Assumed cause of infertility	Successful IVF/ICSI treatment (Failure of IVF/ICSI treatment)	LIF mutation- positive women
176 infertile women	A1 = 57 women with primary idiopathic infertility and history of IVF or ICSI treatment failure	8 (48)	1 (1)
A = primary infertility	A2 = 90 women with primary infertility with known etiology		
	Anovulation	3 (5)	1 (0)
	Tubal blockage	9 (2)	0 (0)
	Endometriosis	4 (11)	0 (1)
	Male subfertility	22 (20)	0 (0)
	Combination of factors	10 (5)	0 (0)
B = secondary infertility	B = 29 women with secondary infertility	17	1 (1)
	History of miscarriage	9 (8)	1 (1)
	or ectopic pregnancy	12	5 (7)
75 Healthy control subjects	Conceived spontaneously and delivered successfully at least ones in their history	– (–)	– (–)

2.2. DNA extraction

Peripheral blood leukocytes were used for the DNA isolation in all cases. DNA was isolated by the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer's protocol.

2.3. Polymerase chain reaction (PCR) and mutation status of the LIF gene

The coding regions were analyzed by the Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE). For this purpose, the exon 3 was divided into three parts so the LIF gene was finally screened and divided into five partly overlapping fragments. PCR was performed using five sets of primers listed in Table 2. Primers were modified using the Poland java script (www.biophys.uni-duesseldorf.de/POLAND/poland.html) by GC-clamp addition to create a thermostable domain suitable for TGGE. The reaction conditions were as follows: 12.5 µl of HotStart Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 10 pmol of each primer, 100 ng of DNA and distilled water up to 25 µl. The amplification program consisted of denaturation at 95 °C for 15 min and then 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min. PCR was finished by a final extension at 72 °C for 7 min. The amplification program was the same for all analyzed exons except exon 1 where the annealing temperature was 50 °C. The length and the quality of the PCR products were checked in standard agarose gels.

Table 2
Table of primers

Exon	Name	Sequence 5' → 3'
E1	E1F-GC	<i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCG</i> <i>GGCCCGCCGCCCCGCGCCG</i> CTATGATGCACCTCAAACAA ^a GGGGCGGGTGTATTTA ^a
	E1R	
E2	E2F	GCCACCTTTCCTGCCTTCTAC ^b <i>CGGGCGGGGGCGGGCGGG</i> <i>GCGCGGGGGCGGGGGGG</i> TCCTGCCATCTCTGTACGATATC ^b
	E2R-GC	
E3.1	E3.1F-GC	<i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCG</i> <i>CCCGCCGCCCCGCGCCG</i> ACAATCCAGATGCTTACAGGG ^b <i>GCGGGGCCAAGGTACACGACTATGC</i> ^b
	E3.1R-GC	
E3.2	E3.2F	CCCAACAACCTGGACAAGCTATG ^b <i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCG</i> <i>CCCGCCGCCCCGCGCCG</i> CCGTAGGTACGTCCACATG ^b
	E3.2R-GC	
E3.3	E3.3F-GC	<i>CCCGCCTCCTTAGCAACGTGCTGT</i> ^a <i>CGGGCGGGGGCGGGCGGG</i> <i>CGCGGGGGCGGGGGGG</i> ACATCTGGACCCAACCTCTG ^a
	E3.3R-GC	

GC clamps in Italics.

^a Our original primers.

^b Primers inspired by Giess [28].

Table 3

The temperature gradients for parallel TGGE gels

Exon	Temperature gradients (°C)
E1	55–63
E2	53–65
E3.1	58–66
E3.2	60–65
E3.3	58–62

Screening of mutations was performed by heteroduplex analysis on TGGE (Biometra, Goettingen, Germany) on 8% denaturing acrylamide gel (AA:bis-AA (5:1) [37], 6 M urea, 1× MOPS, 2% glycerol). The TGGE analysis was performed in two steps—electrophoresis conditions for parallel gels for each exon had to be at first optimized by perpendicular gels. Consequently, the parallel gels for patients' samples were run. The running time is constant for all exons 1 h 30 min, the temperature gradients for each exon are shown in Table 3. DNA bands were detected by silver staining method according to standard protocol [30].

The relevant DNA samples of all women positive in TGGE analysis were amplified and sequenced by automated sequencing using a Big Dye Terminator Sequencing Kit (PE/Applied Biosystems, Foster City, USA). The samples were run on automated sequencer ABI Prism 3100 Avant (PE/Applied Biosystems) at a constant voltage of 12.2 kV for 180 min. In order to avoid errors, all PCR and sequencing experiments were repeated at least twice in TGGE positive patients.

2.4. Statistical analysis

The groups of fertile controls and infertile patients were compared for statistically significant differences using the *t*-test.

3. Results

Six positive samples were identified by TGGE in exon 3.2 in the group of infertile women ($n = 176$). All samples showed an alteration in DNA sequence that was identical to previously described potentially functional LIF gene point mutation, the G to A transition at the position 3400. It is known that this mutation leads to an amino acid exchange of valin to methionin (V64M) in the region corresponding to AB loop of the LIF protein. The AB loop seems to be highly important for interaction with the LIF-R, so that the mutation causing the amino acid exchange within the region could result in reduced biological activity of the LIF protein [28].

All six mutation-positive women were infertile. Four of them were diagnosed with primary infertility and had a history of at least one unsuccessful IVF cycle. Out of these four, one of them was diagnosed with primary idiopathic infertility and did not succeed in IVF/ICSI twice. The second was diagnosed with endometriosis and failed to succeed in IVF/ICSI twice.

The third one of them was diagnosed with primary idiopathic infertility but she became pregnant after second IVF treatment. The fourth suffered by ovulation disorder and became pregnant after second IVF cycle.

The final two mutation-positive women belonged to the group of secondary infertile women. They both became pregnant spontaneously but suffered from early miscarriages at the 7th and 8th week of their pregnancies. Subsequently, one of them had a history of a single unsuccessful IVF/ICSI cycle and the other delivered successfully after second IVF.

No positive TGGE samples were identified in the control group, which means that the frequency of functionally relevant mutations of the LIF gene in infertile women is significantly elevated in comparison with controls ($P < 0.05$, *t*-test).

4. Discussion

LIF gene mutations in nulligravid infertile women have already been described in two papers. The first report in 1999 searched for mutations in 74 non-selected nulligravid infertile women and three point mutations were identified. Two of them were the G to A transitions located in exon 3 at the positions 3400 and 3424 of the LIF gene that lead to an amino acid exchange in the regions corresponding to AB loop of the LIF protein. The third mutation, the C to A transition at position 715, was located in the regulatory region 6 bp from the start codon of the LIF gene. It is hypothesized that this mutation led to transcription abnormalities and result in the decreased LIF expression [28].

The second report focused on women with recurrent failure of IVF or ICSI, defined as three or more embryo transfers ($n = 45$), and on women diagnosed with unexplained infertility for at least 2 years ($n = 50$). The previously described G to A transition at the position 3400 and the G to A transition at position 3441 were identified in nulligravid women with unexplained infertility. The G to T transition at the position 3453 was identified in a nulligravid woman with more than three failures of IVF. Both newly described transitions, at the position 3453 and 3441, did not cause the protein structure alterations. The C to A transition at the position 3235 in the intronic part between exons 2 and 3 was found in a control fertile individual. The only one woman with the heterozygous potentially functional mutation at position 3400 conceived after IVF treatment. The authors suggested that the second allele of the LIF gene, stimulated hormonally during super ovulated cycle could compensate the defect [29]. Their hypothesis was supported by recent study, which demonstrated that LIF on luminal epithelium enhances the expression of a subset of progesterone-regulated genes [31].

Our study is the first report identifying potentially functional LIF gene mutations not only in nulligravid infertile patients but also in two women who became pregnant spontaneously. Both of them suffered from early miscarriages and that is why we hypothesize that the fully

functional LIF gene could be in these cases important not only for the embryo implantation but also for its further development.

The mechanisms that compensate for the LIF defects are not clear yet. The role of the second LIF gene allele and the hormonal stimulation were hypothesized in both above quoted reports [28,29]. Our results showed that the conception is possible not only after the hormonal stimulation but also spontaneously, without any treatment. In our opinion, the other compensatory mechanisms could rely on a cooperation of a row of various regulatory molecules, most probably again of cytokine nature.

One of the possible mechanisms how LIF gene mutations could affect implantation and early blastocyst development is through endometrial leukocytes. The endometrial leukocytes are submitted to complex morphological, biochemical and functional changes during the menstrual cycle and play important role in implantation and pregnancy establishment [for review see 32]. All their regulatory factors, both endometrial and embryonic origin, are balanced by homeostatic mechanisms regulated by neuroendocrine system. This is the reason why stress and the patient's strategy for coping with it might influence the fertility [33,34]. The influence of the LIF gene absence on the infiltrating lymphoid cell populations was already shown in mice. In the LIF knockout mice the percentage of macrophages was reduced by more than half and their distribution was disrupted suggesting that LIF is a chemokine for these cells. On the other hand, the NK cells were doubled compared to wild type mice, indicating that LIF restricts the migration of NK cells to the uterus [35].

As earlier suggested by Giess et al. [28], LIF substitution in infertile women with LIF gene mutation might serve as a therapeutic option. Borini et al. attempted in 1997 the local LIF administration during the IVF at the time of embryo transfer but the patients' population was not examined for the LIF gene mutations so his results were not conclusive [36]. The beneficial effects of LIF on blastocyst development and morphology were observed in several studies [37,38]. In our opinion, the local LIF application, most probably in culture media or with the transfer media at the time of embryo transfer, specifically to the LIF gene mutation-positive women, could increase their chances for the successful conception. In general, supplementation of culture media with cytokines or growth factors is still an attractive approach in enhancing embryo viability and implantation rate. The beneficial effect of LIF in improving implantation and subsequent increased birth rates should be explored further.

Acknowledgements

This study was supported by the grant agency of Czech Republic, grant no. 301/05/0078, the Institutional Research Concept AV OZ 50200510 and by the Institutional Research Concept MSM 0021620812.

References

- [1] Dominguez F, Pellicer A, Simon C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal–embryonic interface—a review. *Placenta* 2003;24(Suppl. B):S48–55.
- [2] Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update* 1998;4(5):465–71.
- [3] Herrler A, von Rango U, Beier HM. Embryo–maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online* 2003;6(2):244–56.
- [4] Giudice LC. Genes associated with embryonic attachment and implantation and the role of progesterone. *J Reprod Med* 1999;44(Suppl. 2):165–71.
- [5] Salamonsen LA, Woolley DE. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endometrial remodelling and menstruation. *Reprod Med Rev* 1996;5:185–203.
- [6] Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *J Reprod Med* 2003;48(3):137–47.
- [7] Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992;359(6390):76–9.
- [8] Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev* 1994;39(2):233–8.
- [9] Vogiatzis D, Marsh MM, Fry RC, Salamonsen LA. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol* 1996;148(1):95–102.
- [10] Vogiatzis D, Salamonsen LA. Review: the role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol* 1999;160(2):181–90.
- [11] Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Lo HY. Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases. *Assist Reprod Genet* 2000;17(8):415–8.
- [12] Charnock-Jones DD, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil* 1994;101:421–6.
- [13] Metcalf D. Leukemia inhibitory factor—a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors* 1992;7:169–73.
- [14] Escary JL, Perreau J, Duménil D, Enize S, Brulet P. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 1993;363(6427):361–4.
- [15] Kojima K, Kanzaki K, Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 1994;50(4):882–7.
- [16] Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(6):1908–15.
- [17] Cullinan EB, Abondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(7):3115–20.
- [18] Keltz MD, Attar E, Buradaqunta S, Olive DL, Kliman HJ, Arici A. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(6):1611–9.
- [19] Robb L, Dimitriadis E, Li R, Salamonsen LA. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation. *J Reprod Immunol* 2002;57(1/2):129–41.
- [20] Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil* 1994;101(2):421–6.
- [21] Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997;12(3):569–74.
- [22] Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998;39(2):137–43.
- [23] Delage G, Moreau JF, Taupin JL, et al. In vitro endometrial secretion of human interleukin for DA cells/leukaemia inhibitory factor by explant cultures from fertile and infertile women. *Hum Reprod* 1995;10(9):2483–8.
- [24] Piccinni MP, Scaletti MP, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2001;52(1/2):35–43.
- [25] Stahl J, Gearing DP, Wilson TA, Brown MA, King JA, Gough NM. Structural organization of the genes for murine and human leukemia inhibitory factor. Evolutionary conservation of coding and non-coding regions. *J Biol Chem* 1990;265(15):8833–41.
- [26] Haines BP, Voyle RB, Pelton TA, Forrest R, Rathien PD. Complex conserved organization of the mammalian leukemia inhibitory factor gene: regulated expression of intracellular and extracellular cytokines. *J Immunol* 1999;162(8):4637–46.
- [27] Willson TA, Metcalf D, Gough NM. Cross-species comparison of the sequence of the leukemia inhibitory factor gene and its protein. *Eur J Biochem* 1992;204(1):21–30.
- [28] Giess R, Tanasescu I, Steck T, Sendtner M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod* 1999;5(6):581–6.
- [29] Steck T, Giess R, Suetterlin MW, et al. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;112(1):69–73.
- [30] Beranova M, Oliveira LM, Bedecarrats GY, et al. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(4):1580–8.
- [31] Sherwin J, Freeman T, Stephens R, et al. Identification of genes regulated by leukaemia inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol Endocrinol* 2004;18(9):2185–95.
- [32] Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:656–63.
- [33] Ledee-Bataille N, Koepfel B, Frydman R, Chauat G. The impact of stress in the materno-fetal relationship: an immunological approach. *Gynecol Obstet Fertil* 2003;31(9):778–81.
- [34] Brandt KH, Zech H. Effects of short-term psychotherapy on the success of an in vitro fertilization/embryo transfer program. *Wien Med Wochenschr* 1991;141:17–9.
- [35] Schofield G, Kimber SJ. Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. *Biol Reprod* 2004 (Epub ahead of print).
- [36] Borini A, Bulletti C, Cattoli M, et al. Use of recombinant leukemia inhibitory factor in embryo implantation. *Ann NY Acad Sci* 1997;828:157–61.
- [37] Cheung LP, Leung HY, Bongso A. Effect of supplementation of leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor on murine embryonic development in vitro, implantation, and outcome of offspring. *Fertil Steril* 2003;80(Suppl. 2):727–35.
- [38] Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Bosch P, Hollet BR, Lott JD, Brackett BG. Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced in vitro under chemically defined conditions. *Theriogenology* 2003;59(8):1751–63.

Příloha č. 6.

Králíčková, M., Ulčová-Gallová, Z., Šíma, R., Vaněček, T., Šíma, P.,
Křížan, J., Suchá, R., **Uher, P.**, Hes, O., Novotný, Z., Rokyta, Z.,
Větvicka, V.

Preliminary report on the association of the leukemia inhibitory factor
gene mutation and the antiphospholipid antibodies in the peripheral
blood of infertile women.

Folia Microbiologica. 2007, roč. 52, č. 5, s. 543-548.

IF= 1,034, citováno 3x.

Association of the Leukemia Inhibitory Factor Gene Mutation and the Antiphospholipid Antibodies in the Peripheral Blood of Infertile Women

M. KRÁLÍČKOVÁ^a, Z. ULČOVÁ-GALLOVÁ^a, R. ŠÍMA^b, T. VANĚČEK^b, P. ŠÍMA^c, J. KRÍŽAN^c, R. SUCHÁ^{a,d}, P. UHER^{a,d}, O. HES^b, Z. NOVOTNÝ^a, Z. ROKYTA^a, V. VĚTVIČKA^c

^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, Faculty of Medicine, Charles University, 301 66 Plzeň, Czechia

^bDepartment of Pathology, University Hospital, Faculty of Medicine, Charles University, 301 66 Plzeň, Czechia

^cDepartment of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague, Czechia

^dInstitute of Reproductive Medicine and Endocrinology, University Hospital, Faculty of Medicine, Charles University, 301 77 Plzeň, Czechia

^eDepartment of Pathology, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA

fax +420 377 105 290

e-mail M.Kralickova@seznam.cz

Received 5 December 2006

Revised version 12 April 2007

ABSTRACT. To characterize the impact of the potentially functional mutation – the G to A transition at the position 3400 of the leukemia inhibitory factor (LIF; a pluripotent cytokine that plays a central role in the control of the embryo implantation) gene that leads to the exchange of valine with methionine at codon 64 we evaluated the association of the LIF gene mutation and the levels of antiphospholipid antibodies (aPLs) in the peripheral blood of infertile women (the aPLs examination was part of our routine immunological test during the infertility check-up). Eight infertile mutation-positive women were diagnosed with idiopathic infertility ($n = 5$) and endometriosis ($n = 3$) and their levels of aPLs in serum were compared with 115 infertile women without any LIF gene mutation. Enzyme-linked immunosorbent assay was used for the detection of seven antiphospholipid antibodies; the results were statistically assessed by the Fisher's 2 by 2 exact test to evaluate the association of the LIF gene mutations and aPLs in serum of infertile patients. The presence of aPLs was significantly higher in our study group (100 %) than in 30 % of aPLs-positives in control infertile patients ($p = 0.0035$) which indicates that the aPLs are elevated in women with LIF gene mutations.

Abbreviations

aPLs	antiphospholipid antibodies	LIFR	LIF receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	NK	natural killer (cells)
FCS	fetal calf serum	ph-Ser	L-phosphatidyl-serine
IVF	<i>in vitro</i> fertilization	SD	standard deviation
LIF	leukemia inhibitory factor	TGGE	temperature gradient gel electrophoresis

Out of the many cytokines that take part in the endometrium–blastocyst cross talk, LIF has been found to be essential for the embryo implantation process (*see, e.g.,* Králíčková *et al.* 2005). In endometrium of healthy women, LIF and LIF mRNA are expressed throughout the menstrual cycle with a striking increase in the mid-secretory phase, coinciding with a supposed window of implantation. LIF acts on cells by binding to LIFR and gp130. Human blastocysts express mRNAs for LIFR and gp130, participating actively in establishing contact with the endometrium. In the endometrium, LIFR and gp130 are expressed in the epithelium throughout the cycle with strong increase in the mid-secretory phase (for review *see* Aghajanova 2004).

The *lif* knockout mice have doubled the percentage of uterine NK cells compared to the wild-type mice at the time of implantation window, indicating that LIF restricts the migration of NK cells to the uterus (Schofield and Kimber 2004).

It has been demonstrated that certain phospholipids are exposed on the endothelial surface and may interact with syncytiotrophoblast and cytotrophoblast layers and alter implantation during natural as well as *in vitro* fertilization as well as the feto–maternal interactions during the rest of pregnancy (Aron *et al.* 1995). aPLs have an established association with recurrent miscarriage, embryo implantation failure, growth retardation, placental abruption and stillbirth (Balasch *et al.* 1996; McIntyre 2003; Coulam *et al.* 1997). Because some investigators showed contrary results (Kowalik *et al.* 1997; Eldar-Geva *et al.* 1999), the relevance of

the presence of aPLs to embryo implantation, infertility and IVF outcome and their mechanism of action is still a matter of discussion.

The link between NK cells and aPLs has been established. Women with recurrent miscarriages and antiphospholipid antibodies showed significantly elevated NK cells than women without these antibodies. In addition, women with other infertility diagnoses and autoantibodies to phospholipids have significantly higher levels of NK cells than women without antiphospholipid antibodies (Kwak *et al.* 1995; Beer *et al.* 1996). A relationship between increased natural killer-cell activity, increased serum levels of aPLs and trophoblast cell apoptosis has been reported (Roussev *et al.* 1996; Kaider *et al.* 1999; Sher *et al.* 2000).

The role of *lif* gene mutations in embryo implantation failure and in infertility remains in general unclear. In infertile women, three heterozygous potentially functional point mutations have so far been identified (Giess *et al.* 1999; Steck *et al.* 2004); these studies conclude that heterozygosity for *lif*-gene mutations leading to decreased availability or specific biological activity of the LIF protein could act as genetic predisposition of infertility due to its impact on the efficacy of embryo implantation.

We proved that the LIF gene mutations are not restricted to nulli gravid patients or to other infertility diagnoses (*i.e.* to anovulation, tubal factor, endometriosis, male factor or idiopathic infertility); it is unfortunate that we were not able to characterize the detected mutations (Králíčková *et al.* 2006). While the significance of LIF gene alterations, their functional consequences and clinical impacts are still not fully understood, here we focus on their characterization by examining their association with increased levels of aPLs in the peripheral blood of infertile patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Eight women (average age 35.2 ± 3 years) with potentially functional *lif* mutation, the G to A transition at the position 3400 leading to the exchange of valine with methionine at codon 64 (V⁶⁴M) in the AB loop region of the LIF protein (study group) and 115 infertile women (average age 33.5 ± 6 years) without any LIF gene mutation (control group) were included.

The control group comprised 10 patients diagnosed with endometriosis and 32 patients diagnosed with unexplained infertility (group 1) plus 73 patients diagnosed with male factor (group 2). Endometriosis patients comprised all the stages of disease. Patients classified as idiopathic (unexplained) infertility were documented by laparoscopy to have patent tubes, were free of pelvic adhesions and endometriosis, and had a normal uterine cavity by hysteroscopy or hysterosalpingography. They had normal ovulation and there was no evidence of male factor, antisperm or zona pellucida antibodies.

The study was approved by the Charles University Ethics Committee and informed consent was obtained from all individuals.

DNA extraction, PCR and mutation status of the *lif* gene. Peripheral blood leukocytes were used for the DNA isolation in all cases; it was isolated by the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Germany) according to manufacturer's protocol. The coding regions and the exon-intronic junctions were analyzed by TGGE. The exon 3 was divided into 3 parts and *lif* was screened and divided into 5 partly overlapping fragments. PCR was performed using five sets of primers (Table I) which were modified using Polish java script (www.biophys.uni-duesseldorf.de/POLAND/poland.html) by GC-clamp addition to create a thermostable domain suitable for TGGE. The reaction conditions were as follows: 12.5 μ L of HotStart Taq PCR Master Mix (Qiagen), 10 pmol of each primer, 100 ng of DNA and distilled water up to 25 μ L. The amplification program consisted of denaturation (15 min, 95 °C), 35 cycles of denaturation (30 s, 95 °C), annealing (30 s, 60 °C), extension (1 min, 72 °C) and final extension (7 min, 72 °C). The amplification program was the same for all analyzed exons except for exon 1 where the annealing temperature was 50 °C. The length and the quality of the PCR products were checked in standard agarose gels.

Screening of mutations was done by heteroduplex analysis on TGGE (Biometra, Germany) on 8 % denaturing acrylamide (AA) gel (AA-bis-AA 375:10, 6 mol/L urea, 1 \times Mops, 2 % glycerol). The TGGE analysis was performed in two steps – electrophoresis conditions for parallel gels for each exon had to be at first optimized by perpendicular gels. Consequently, the parallel gels for patients' samples were run. The running time was 1.5 h at temperature gradient (Table I). DNA bands were detected by silver-staining method according to standard protocol (Beranová *et al.* 2001; Králíčková *et al.* 2006).

The relevant DNA samples of all women positive in TGGE analysis were amplified and sequenced by automated sequencing using a Big Dye Terminator Sequencing Kit (PE/Applied Biosystems, USA). The samples were run on automated sequencer ABI Prism 3100 Avant (PE/Applied Biosystems) at a constant voltage of 12.2 kV for 18 min. In order to avoid errors, all PCR and sequencing experiments were repeated a minimum of two times in TGGE positive patients.

Table 1. Table of primers^a and temperature gradients for parallel TGGE gels

Exon	Primer	Sequence 5' → 3'	Temperature gradient, °C
E1	E1F-GC	<i>CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC G</i> CTA TGA TGC ACC TCA AAC AA*	55–63
	E1R	GGG GCG GGT GTA TTT A*	
E2	E2F	GCC ACC CTT TCC TGC CTT TCT AC**	53–65
	E2R-GC	<i>CGG GCG GGG GCG GCG GGC CCG GCG CCG GGC GCG GCG GGC G</i> TCC CTG CCA TCT CCT GTC AGT ATC**	
E3.1	E3.1F-GC	<i>CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC G</i> ACA ATT CCA GAT GCT TAC AGG G**	58–66
	E3.1R-GC	GCGGG GCC AAG GTA CAC GAC TAT GC**	
E3.2	E3.2F	CCC AAC AAC CTG GAC AAG CTA TG**	60–65
	E3.2R-GC	<i>CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C</i> CCG TAG GTC ACG TCC ACA TG**	
E3.3	E3.3F-GC	CCCGC CCT CCT TAG CAA CGT GCT GT*	58–62
	E3.3R-GC	<i>CGG GCG GGG GCG GCG GGC CCG GCG CCG GGC GCG GCG GGC G</i> ACA TCT GGA CCC AAC TCC TG*	

^aIn italics – GC clamps; * – our original primers; ** – primers according to Giess *et al.* (1999).

ELISA for detection of antiphospholipid antibodies was used in all the women for the detection of seven antiphospholipid antibodies: aPLs against cardiolipin, ph-Ser, ph-glycerol, ph-inositol, ph-ethanolamine, phosphatidic (ph)-acid (*Sigma*, USA) and against β_2 -glycoprotein I of class IgG, IgA, and IgM. As shown earlier, this complete aPLs panel using the above isotypes is suitable (Coulam *et al.* 1997; Ulčová-Gallová *et al.* 2002) and was used as a part of our previous examination.

Blood was centrifuged and kept at $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ before analysis. For ELISA, polystyrene microtiter plates were coated with 50 μL solution of phospholipid (50 μL per 1 mL of methanol) and were allowed to dry overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The plates were then blocked by solution containing 10 % FCS in 1 mol/L Tris buffer (TBS; 250 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mol/L NaCl; pH 7.4) for 30 min at room temperature. The plates were then washed thrice by binding buffer (g/L: NaHCO_3 2.93, Na_2CO_3 1.59, NaN_3 0.2; pH 9.6).

Sera from patients and controls, diluted 1:50 in TBS containing 10 % FCS, were added to the wells after the wash. The plates were incubated for 2 h at room temperature, and then washed 5 \times with TBS with 5 % Tween 20. Fifty μL of peroxidase-conjugated anti-human immunoglobulin (IgG, IgA, or IgM) was added and incubated for 1 h at room temperature. The plates were then washed 5 \times in TBS-Tween. Fifty μL of substrate solution was added to each well and incubated in the darkness for 30 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 50 μL of 2 mol/L sulfuric acid. The absorbance of each well was determined using a Titertek Multiscan MCC/340 (*Flow Laboratories*, UK) at 492 nm. Background absorbance was run for all patient's sera diluted 1:50 in wells on identical microtiter plates coated with methanol but without phospholipids. The phospholipids used to coat the ELISA plates were: ph-serine, ph-ethanolamine, ph-inositol, ph-glycerol, phosphatidic acid.

Commercial ELISA was used for detection of antibodies against cardiolipin (*Milenia*, UK) and β_2 -glycoprotein I (*Immunotech*, Czechia).

Statistical analysis was performed by cut-off levels for Ig-isotypes of aPLs obtained from 3 SD or 95th percentile which were calculated using Statgraphics software.

The results were statistically assessed by the Fisher's 2 by 2 exact test to evaluate the association of the LIF gene mutations and aPLs in serum of infertile patients; $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Eight infertile women were found with potentially functional LIF gene mutation – the G to A transition at the position 3400 leading to the valine to methionine exchange at codon 64 (V^{64}M) in the AB loop region of the LIF protein. The aPLs detection in the peripheral blood (which was part of their immunologic

examination during their infertility check-up) showed that aPLs levels significantly increased in all LIF gene mutation-positive women (100 %). Five of them who were diagnosed with idiopathic infertility had increased levels of antibodies against ph-Ser. None of them became pregnant after the first IVF treatment. A corticoid was applied in all these cases during the second IVF-ET without any success in three of them; the two others became pregnant. The other three LIF gene mutation-positive women were diagnosed with endometriosis. They had increased levels of antibodies against ph-Ser (two cases) and cardiolipin. All of them got pregnant after IVF treatment.

In the control population, only 35 infertile patients were aPLs positive (30 %). Five of them were diagnosed with endometriosis (50 % of endometriosis patients), 15 of them were diagnosed with unexplained infertility (47 % of unexplained infertility patients) and 15 of them were diagnosed with male factor (20 % of male factor patients).

The presence of aPLs was significantly higher (100 %) than 30 % of aPLs positives in the control group of infertile patients with no LIF gene mutation ($p = 0.0035$). Comparing the study group (100 %) and control group 1 (48 %) showed that the presence of aPLs is higher in our study group but the difference is on the border of statistic significance ($p = 0.051$).

DISCUSSION

Comparing the two control groups we confirmed the data of Sher *et al.* (1994) who showed that the presence of aPLs is significantly higher in women diagnosed with endometriosis (50 %) and unexplained infertility (47 %) than in women infertile because of the male factor (20 %) ($p = 0.01$) (Table II).

Table II. Control population – infertile women with no mutation in the LIF gene

Diagnose	Number of patients	aPLs positive	
		n^a	%
Unexplained infertility	32	15	46.9
Endometriosis	10	5	50.0
Group 1 (unexplained infertility + endometriosis)	42	20	47.6
Group 2 (male factor)	73	15	20.5
Total	115	35	30.4

^a n – number of cases.

Our results suggest that LIF gene mutations are associated with the presence of aPLs in serum of infertile patients. We hypothesize that this is due to the LIF impact on NK cell population that is functionally connected with the presence of aPLs. Nevertheless, the mechanism is still unclear.

An area of active investigation is the field of aPLs and uterine leukocytes interactions when there is the possibility that aPLs do not directly cause reproductive failure but rather function as markers or intermediaries for an underlying, abnormal activation of cellular immunity. As in autoimmune syndromes, it is possible that aPLs are secondary to some underlying disease or that they are instrumental

in the pathogenesis of the various manifestations (Ulčová-Gallová *et al.* 1996, 1998).

NK cells are an important component of decidualised endometrium in normal human pregnancy and they are believed to regulate the migration and differentiation of highly invasive trophoblast.

In the peripheral blood, it was proven that diminished numbers of the CD56⁺ CD16-CD3-NK cells are related to infertility (Michou *et al.* 2003). Infertile women have a significantly higher expression of NK cell activation markers (CD69⁺ and CD161⁺) than control fertile women (Ntrivalas *et al.* 2001; Coulam and Roussev 2003). NK-cell activity was significantly higher than in the control group (Matsubayashi *et al.* 2001).

In the endometrium throughout the luteal phase, infertile women have fewer CD56⁺ cells than normal fertile controls. It was hypothesized that the differences observed in endometrial leukocytic subpopulations between fertile and infertile women may contribute to unexplained infertility probably by affecting the embryonic maternal dialogue during the implantation and early placentation period (Klentzeris *et al.* 1994).

If we divide infertile women according to the cause of infertility, the deregulation of NK-cell subpopulations has been implicated in the etiopathogenesis of the unexplained infertility as well as endometriosis. The differences observed in the follicular fluid (FF) compared to fertile controls may explain the defects in folliculogenesis and oocyte maturation and in these patients these modifications could be one of the factors altering their fertility (Lukassen *et al.* 2003).

The exact mechanism of NK-cell regulation in infertility is not yet understood. The possible mechanism is the regulation by cytokines (Saito *et al.* 1993; Kubrycht *et al.* 1993; Jokhi *et al.* 1994; Nakamura *et al.*

al. 1998). We currently do a study that examines the differences of endometrial NK-cell population in cases of various causes of infertility with regard to the *lif* gene mutation presence.

Even though the LIF gene mutations are quite rare in the population of infertile women (for that reason they are probably not very valuable for clinical management of infertility) we believe that their importance is in being a unique model of LIF actions.

Immunological alterations may be triggered by the LIF gene mutation and may be involved in the etiopathogenesis of unexplained infertility as well as of endometriosis. Furthermore, the immunological diagnostics in the group of patients with unexplained infertility and endometriosis might be useful. The prevalence of aPLs in serum of LIF gene mutation-positive infertile women and the prognostic significance in women undertaking both the natural and the assisted conception needs to be established in a larger study with a greater number of patients positive for the LIF gene mutation. The complexity of pathogenesis of infertility and embryo implantation failure justifies further investigation.

This study was supported by the *Grant Agency of the Czech Republic* (grant no. 301/05/0078; M. Králíčková), by the *Institutional Research Concept of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic* (MŠM 0021620812; Z. Ulčová-Gallová) and the *Institutional Research Concept of the Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic* (AV OZ 50200510; P. Šíma). The authors thank Dr. F. Šefna for supervision of statistical analysis, Mrs. P. Nováková for assistance with sample collection, and Mrs. R. Williams for critical reading of the text.

REFERENCES

- AGHAJANOVA L.: Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Am.N.Y.Acad.Sci.* **1034**, 176–183 (2004).
- ARON A.L., GHARAVI A.E., SHOENFELD Y.: Mechanisms of action of antiphospholipid antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Internat.Arch.Allergy Immunol.* **106**, 8–12 (1995).
- BALASCH J., CREUS M., FABREGUES F., REVERTER J.C., CARMONA F., TASSIES D., FONT J., VANRELL J.A.: Antiphospholipid antibodies and human reproductive failure. *Human Reprod.* **11**, 2310–2315 (1996).
- BEER A.E., KWAK J.Y., RUIZ J.E.: Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed *in vitro* fertilization cycles. *Am.J.Reprod.Immunol.* **35**, 376–382 (1996).
- BERANOVA M., OLIVEIRA L.M., BEDECARRATS G.Y., SCHIPANI E., VALLEJO M., AMMINI A.C., QUINTOS J.B., HALL J.E., MARTIN K.A., HAYES F.J., PITTELOU N., KAISER U.B., CROWLEY W.F. Jr., SEMINARA S.B.: Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **86**, 1580–1588 (2001).
- COULAM C.B., KAIDER B.D., KAIDER A.S., JANOWICZ P., ROUSSEV R.G.: Antiphospholipid antibodies associated with implantation failure after IVF/ET. *J.Assist.Reprod.Genet.* **14**, 603–608 (1997).
- COULAM C.B., ROUSSEV R.G.: Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after *in vitro* fertilization and embryo transfer. *J.Assist.Reprod.Genet.* **20**, 58–62 (2003).
- ELDAR-GEVA T., WOOD C., LOLATGIS N., ROMBAUTS L., KOVACS G., FUSCALDO J., TROUNSON A.O.: Cumulative pregnancy and live birth rates in women with antiphospholipid antibodies undergoing assisted reproduction. *Human Reprod.* **14**, 1461–1466 (1999).
- GISS R., TANASESCU I., STECK T., SENDTNER M.: Leukemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol.Human Reprod.* **5**, 581–586 (1999).
- JOKHI P.P., KING A., SHARKEY A.M., SMITH S.K., LOKE Y.W.: Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J.Immunol.* **153**, 4427–4435 (1994).
- KAIDER A.S., KAIDER B.D., JANOWICZ P.B., ROUSSEV R.G.: Immunodiagnostic evaluation in women with reproductive failure. *Am.J.Reprod.Immunol.* **42**, 335–346 (1999).
- KLENTZERIS L.D., BULMER J.N., WARREN M.A., MORRISON L., LI T.C., COOKE I.D.: Lymphoid tissue in the endometrium of women with unexplained infertility: morphometric and immunohistochemical aspects. *Human Reprod.* **9**, 646–652 (1994).
- KOWALIK A., VICHNIN M., LIU H.C., BRANCH W., BERKELEY A.S.: Midfollicular anticardiolipin and antiphosphatidylserine antibody titers do not correlate with *in vitro* fertilization outcome. *Fertil.Steril.* **68**, 298–304 (1997).
- KRÁLÍČKOVÁ M., ŠÍMA P., ROKYTA Z.: Role of the leukemia-inhibitory factor gene mutations in infertile women: the embryo-endometrial cytokine cross talk during implantation – a delicate homeostatic equilibrium. *Folia Microbiol.* **50**, 179–186 (2005).
- KRÁLÍČKOVÁ M., ŠÍMA R., VANĚČEK T., ŠÍMA P., ROKYTA Z., ULČOVÁ-GALLOVÁ Z., SUCHÁ 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.* **127**, 231–235 (2006).
- KUBRYCHT J., MALÍKOVÁ P., HUAN N.H., FIŠEROVÁ A., BEZOUŠKA K., KRUŽÍK P., STAJNER K., MORAVEC V., POSPÍŠIL M.: Peripheral membrane molecules of leukocytes and NK cytotoxicity. *Folia Microbiol.* **38**, 421–431 (1993).
- KWAK J.Y., BEAMAN K.D., GILMAN-SACHS A., RUIZ J.E., SCHEWITZ D., BEER A.E.: Up-regulated expression of CD56⁺, CD56⁺/CD16⁺, and CD19⁺ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am.J.Reprod.Immunol.* **34**, 93–99 (1995).
- LUKASSEN H.G., VAN DER MEER A., VAN LIEROP M.J., LINDEMAN E.J., JOOSTEN I., BRAAT D.D.: The proportion of follicular fluid CD16⁺ CD56 DIM NK cells is increased in IVF patients with idiopathic infertility. *J.Reprod.Immunol.* **60**, 71–84 (2003).
- MATSUBAYASHI H., HOSAKA T., SUGIYAMA Y., SUZUKI T., ARAI T., KONDO A., SUGI T., IZUMI S., MAKINO T.: Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women. *Am.J.Reprod.Immunol.* **46**, 318–322 (2001).
- MCINTYRE J.A.: Antiphospholipid antibodies in implantation failures. *Am.J.Reprod.Immunol.* **49**, 221–229 (2003).

- MICHOU V.I., KANAVAROS P., ATHANASSIOU V., CHRONIS G.B., STABAMAS S., TSILIVAKOS V.: Fraction of the peripheral blood concentration of CD56⁺/CD16⁺/CD3⁺ cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility. *Fertil. Steril.* **80** (Suppl. 2), 691–697 (2003).
- NAKAMURA Y., FUJINO Y., OZAKI K., UEDA K., OZAKI A., ITOH F., OGITA S.: Suppression of natural killer cell activity and interleukin-2 concentration of serum obtained from *in vitro* fertilization–embryo transfer patients. *Am.J.Reprod.Immunol.* **40**, 9–12 (1998).
- NTRIVALAS E.I., KWAK-KIM J.Y., GILMAN-SACHS A., CHUNG-BANG H., NG S.C., BEAMAN K.D., MANTOUVALOS H.P., BEER A.E.: Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown etiology. *Human Reprod.* **16**, 855–861 (2001).
- ROUSSEV R.G., KAIDER B.D., PRICE D.E., COULAM C.B.: Laboratory evaluation of women experiencing reproductive failure. *Am.J.Reprod.Immunol.* **35**, 415–420 (1996).
- SAITO S., NISHIKAWA K., MORI T., ENOMOTO M., NARITA N., MOTYOUSHI K., ICHJO M.: Cytokine production by CD16⁺ CD56^{bright} natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Internat.Immunol.* **5**, 559–563 (1993).
- SCHOFIELD G., KIMBER S.J.: Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. *Biol.Reprod.* **72**, 872–878 (2005).
- SHER G., FISCH J.D., MAASSARANI G., MATZNER W., CHING W., CHONG P.: Antibodies to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine are associated with increased natural killer cell activity in non-male factor infertility patients. *Human Reprod.* **15**, 1932–1936 (2000).
- STECK T., GIESS R., SUETTERLIN M.W., BOLLAND M., WIEST S., POEHLS U.G., DIETL J.: Leukemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur.J.Obstet. Gynecol.Reprod.Biol.* **112**, 69–73 (2004).
- ULČOVÁ-GALLOVÁ Z., KRAUZ V., BOUSE V., NOVOTNÝ Z., ROKYTA Z., FIALOVÁ P., VONDRÁČEK J.: Correlation between peritoneal fluid and serum antiphospholipid antibodies in women with primary infertility. *Internat.J.Fertil.Womens Med.* **43**, 267–272 (1998).
- ULČOVÁ-GALLOVÁ Z., NOVOTNÝ Z., BOUSE V., ŠVÁBEK L., ROKYTA Z., HRADECKÝ L., KNAIZL Z., FIALOVÁ P.: Immunologic factors in the serum and peritoneal fluid in women after laparoscopy. Nonspecific factors. *Česká Gynekol.* **61**, 23–27 (1996).
- ULČOVÁ-GALLOVÁ Z., BOUSE V., ŠVÁBEK L., TUREK J., ROKYTA Z.: Endometriosis in reproductive immunology. *Am.J.Reprod.Immunol.* **47**, 269–274 (2002).