

Wetenschappelijk onderzoek met gebruik van menselijke gameten en embryo's

In het kader van een in-vitro behandeling in het Centrum voor Reproductieve Geneeskunde zullen gameten en/of embryo's aanwezig zijn. In eerste instantie worden deze gebruikt voor het welslagen van de behandeling van de patiënten. Om verscheidene redenen is het echter mogelijk dat deze gameten en embryo's niet langer in aanmerking komen voor terugplaatsing bij de patiënten. De patiënten kunnen ervoor kiezen gameten en embryo's af te staan voor wetenschappelijk onderzoek. Zo wordt een klein percentage van alle embryo's (1-2%) beschikbaar voor onderzoek.

Embryo's bekomen of gebruikt in het kader van onderzoek worden uitsluitend voor wetenschappelijk onderzoek gebruikt. De embryo's zullen in het laboratorium worden gekweekt van dag 0 tot dag 7 en worden vernietigd door de onderzoekstechniek. Indien eicellen ter beschikking worden gesteld voor onderzoek, worden er –mits uitdrukkelijke toestemming van de 'Federale Commissie voor medisch en wetenschappelijk onderzoek op embryo's in-vitro'- embryo's aangemaakt met zaadcellen van een instemmende donor.

De hierna volgende informatie heeft als doel te verduidelijken welk wetenschappelijk onderzoek kan gebeuren op menselijke gameten en embryo's die niet voor de patiënten kunnen gebruikt worden. Dit wetenschappelijk onderzoek wordt uitgevoerd door het Centrum voor Reproductieve Geneeskunde en het Centrum voor Medische Genetica van het UZ Brussel. Het voldoet aan de 'Wet betreffende het onderzoek op embryo's in-vitro' van 11 mei 2003 en werd goedgekeurd door de 'Commissie Medische Ethiek' van het UZ Brussel en de 'Federale Commissie voor medisch en wetenschappelijk onderzoek op embryo's in-vitro'.

Het kan gaan om:

(1) gameten:

- a. eicellen die niet geschikt zijn voor IVF of ICSI omdat ze het geschikte rijpingsstadium niet bereikt hebben;
- b. eicellen die niet bevrucht kunnen worden met zaadcellen van de partner als er na langdurig zoeken in het IVF laboratorium géén zaadcellen werden gevonden in het ejaculaat en/of testiculair biopt, als het gebruik van donorzaadcellen op dat ogenblik geen optie is en als deze eicellen ook geen verdere klinische bestemming kan gegeven worden;
- c. zaadcellen die na IVF of ICSI overgebleven zijn;
- d. zaadcellen die werden ingevroren in het kader van de behandeling en die na de voorziene bewaartermijn afgestaan worden voor wetenschappelijk onderzoek.

(2) embryo's:

- a. afkomstig van abnormaal bevruchte eicellen en die dus niet in de baarmoeder kunnen worden teruggeplaatst;
- b. embryo's van onvoldoende kwaliteit voor terugplaatsing in de baarmoeder of voor bewaring d.m.v. invriezen;
- c. embryo's die werden onderzocht in het kader van pre-implantatie genetische diagnose en een genetische afwijking blijken te hebben;
- d. embryo's die werden ingevroren in het kader van de behandeling en die na de voorziene bewaartermijn afgestaan worden voor wetenschappelijk onderzoek.

De verschillende onderzoeksprojecten zijn:

1. De verfijning van IVF technieken

IVF, ICSI, embryobiopsie, embryocultuur en embryocryopreservatie zijn routine procedures in het Centrum voor Reproductieve Geneeskunde. Het is belangrijk dat personeelsleden opgeleid worden om deze technologieën zo perfect mogelijk uit te voeren. Daarnaast moeten we, waar mogelijk, bestaande procedures verbeteren en nieuwe procedures ontwikkelen.

2. Mannelijke onvruchtbaarheid

Bij dit onderzoek willen we bij de man enerzijds de oorzaken van onvruchtbaarheid opsporen en anderzijds onvruchtbaarheid ten gevolge van steriliserende kankerbehandelingen voorkomen.

Om de oorzaken van mannelijke onvruchtbaarheid te onderzoeken gaan we in een eerste stap na welke genen verantwoordelijk zijn voor het normaal verloop van de zaadproductie. Hiervoor zullen we de aanwezigheid en lokalisatie van verschillende genproducten nagaan in testesweefsel en gameten. Uit de lokalisatie kan immers afgeleid worden in welk stadium deze genen belangrijk zijn. De hoop is om via dit onderzoek een beter inzicht te verwerven in de complexiteit van de zaadproductie. Indien deze genen belangrijk lijken te zijn voor de zaadproductie, zal in een volgende stap nagegaan worden of deze genen verband houden met onvruchtbaarheid. Hiervoor zal nagekeken worden of de aanwezigheid en/of lokalisatie van de genproducten veranderd is bij mannen met een abnormale zaadcelproductie. In een volgende stap gaan we onderzoeken of mutaties kunnen gevonden worden in DNA afgezonderd uit het bloed van patiënten met een fertiliteitsprobleem.

De preventie van onvruchtbaarheid bij steriliserende kankerbehandelingen is een grote uitdaging. Vele kwaadaardige gezwellen kunnen heden efficiënt behandeld worden door middel van chemotherapie, al dan niet gecombineerd met heelkunde of bestraling. De hedendaagse kankerbehandeling streeft echter niet alleen een complete genezing na, doch ook het behoud van de levenskwaliteit na genezing. Het inbanken van zaadcellen voor het starten van een kankerbehandeling blijft momenteel de beste waarborg voor het behouden van de vruchtbaarheid op lange termijn. Zaadcellen worden echter pas vanaf de puberteit gevormd in de zaadvormende buisjes in de zaadballen. Bij het optreden van kwaadaardige gezwellen voor de puberteit stelt er zich dus een probleem. Het inbanken van de stamcellen uit de zaadbal (de cellen die vanaf de puberteit de zaadcellen zullen beginnen vormen) zou een mogelijke preventie ter behoud van de vruchtbaarheid op lange termijn kunnen zijn. Het doel van dit onderzoek is om aan de hand van bij volwassen mannen bekomen zaadbalweefsel dat bv. afgenomen is bij een omkeeroperatie voor het ongedaan maken van sterilisatie en ingevroren is, na te gaan of dit stukje zaadbalweefsel opnieuw zaadcellen kan vormen vanaf de stamcellen. Hierbij kan een stukje zaadbalweefsel naar een laboratoriummuis getransplanteerd worden. Binnen het kader van dit onderzoek gaan we ook na of de voorlopercellen van zaadcellen via een celsorteerder uit het zaadbalweefsel kunnen uitgezuiverd worden. Dit onderzoek is belangrijk om te weten of deze zaadvormende stamcellen gescheiden kunnen worden van eventueel kwaadaardige cellen alvorens over te gaan tot transplantatie.

3. Optimalisatie van in-vitro rijpingsmethoden van onrijpe eicellen

In-vitro maturatie (IVM) van eicellen is een kunstmatige voortplantingstechniek. Hierbij worden met weinig of geen hormoonstimulatie onrijpe eicellen gecollecteerd, die gedurende ongeveer 30 uur in-vitro worden gerijpt en vervolgens bevrucht via intracytoplasmatische sperma-injectie. De eerste IVM-zwangerschap werd in 1991 gerapporteerd. Inmiddels zijn wereldwijd naar schatting meer dan 1000 IVM-kinderen geboren. IVM is, door het ontbreken van de klassieke hormoonstimulatie patiëntvriendelijk, goedkoop en veilig. Het risico van het ovarieel hyperstimulatiesyndroom (OHSS) wordt helemaal vermeden. IVM is daarom vooral aangewezen voor patiënten met een verhoogd risico op OHSS, zoals patiënten met het polycysteus ovariumsyndroom (PCOS). De laatste jaren is de efficiëntie van IVM enorm

toegenomen. Toch blijft de zwangerschapskans na IVM laag, in vergelijking met de klassieke IVF/ICSI methode na ovariële stimulatie. Door middel van moleculair onderzoek zullen we nagaan of de cultuurmethode van IVM kan worden verbeterd, om een betere eicel- en embryokwaliteit te bekomen. Tevens zal worden nagegaan of IVM kan worden toegepast op follikels die bekomen worden uit biopten van de schors van de eierstokken. Dit is belangrijk voor het bewaren van de vruchtbaarheid bij vrouwen die chemo- of radiotherapie moeten ondergaan en bij vrouwen met een beperkte ovariële reserve.

4. Factoren die een rol spelen bij in-vitro bevruchting en de ontwikkeling van het embryo

Onze kennis over de menselijke pre-implantatie ontwikkeling (dit is de periode vóór de innesteling in de baarmoeder) is zeer beperkt. Tijdens deze periode ontwikkelt de bevruchte eicel zich tot een meercellig embryo en vervolgens tot een blastocyst. De blastocyst bestaat uit een kiemknop (de toekomstige foetus) en trofocoderm (een deel van de moederkoek). Het trofocoderm is een gedifferentieerde cellaag die nodig is voor de innesteling in de baarmoeder. Na de terugplaatsing in de baarmoeder gebeurt de innesteling op dag 6-7 van de vroege ontwikkeling.

Door jarenlang onderzoek op embryo's bekomen na in-vitro bevruchting is gekend dat veel ervan, wel tot de helft, abnormale chromosomen hebben. De meeste van deze embryo's met een chromosomale afwijking zullen na het terugplaatsen in de baarmoeder niet overleven. Mogelijks zijn jonge embryo's van minder dan drie dagen oud niet in staat cellen met abnormale chromosomen te elimineren maar kunnen ze dat later (na het ogenblik waarop gewoonlijk naar chromosomen gekeken wordt) en worden dan embryo's met foute chromosomen geëlimineerd of worden de fouten verbeterd. Doel van dit onderzoek is in embryo's te kijken naar de eiwitten die instaan voor de controle mechanismen in cellen en zien wanneer die actief worden. Dit zou ons kunnen helpen om betere cultuursystemen te ontwikkelen voor embryo's bij in-vitro bevruchting, zodat minder embryo's chromosomale afwijkingen vertonen en er dus meer embryo's in staat zijn om tot een gezonde baby te leiden.

Een andere manier om de pre-implantatie ontwikkeling te bestuderen is na te gaan welke cellen in het vroege embryo (2-8 cellen) over de capaciteit beschikken om zich opnieuw te ontwikkelen tot een volledig embryo (16-128 cellen) in het laboratorium. Hiertoe zullen we de aanwezigheid of afwezigheid van welbepaalde stoffen (eiwitten) in de delende embryonale cellen bepalen met behulp van specifieke (moleculair biologische) meettechnieken en microscopie. Uit sommige embryo's zullen stamcellen worden gekweekt, die op hun beurt gebruikt worden voor verder onderzoek (zie ook punt 8). Informatie over het tijdstip waarop en het mechanisme waardoor de cellen van het pre-implantatie embryo gaan differentiëren is belangrijk voor onze kennis over de menselijke embryologie, meer in het bijzonder wat er gebeurt na celverlies tijdens de in-vitro ontwikkeling door fragmentatie, biopsie voor pre-implantatie genetische diagnose (PGD) (zie ook punt 7) en vriesschade (zie ook punt 6). Dit onderzoek zal ook bijdragen tot onze kennis van de stamcelbiologie (zie ook punt 8).

5. Implantatiestoornissen: de interactie tussen embryo en baarmoeder

Met dit onderzoek zullen we nagaan welke factoren bepalen of een embryo zich in de baarmoeder kan innestelen of integendeel afgestoten wordt. Meer in het bijzonder zoeken we een antwoord op de vraag waarom embryo's van goede kwaliteit niet innestelen. Hiervoor wordt de aanwezigheid van bepaalde stoffen in het embryo onderzocht, ofwel met microscopie (onderzoek van eiwitten) ofwel met moleculair biologische technieken (onderzoek van genen). Voor dit onderzoek bestaat de kans dat de embryo's langer dan dag 7 in-vitro gekweekt worden, maar nooit langer dan 14 dagen (conform de wet).

6. De vriesbaarheid van eicellen en embryo's

Niet alle eicellen en embryo's overleven de vries- en dooi-procedures. Bovendien ontstaan na dooi van ingevroren menselijke embryo's vaak embryo's waar intacte blastomeren samen met beschadigde blastomeren voorkomen. Deze embryo's hebben lagere implantatiekansen

na transfer dan volledig intacte embryo's. Het is duidelijk dat het invriezen van eicellen en embryo's kan geoptimaliseerd worden. Onderzoek naar cryopreservatie (dit is het bewaren van cellen door ze in te vriezen) van eicellen en embryo's steunt op 3 pijlers: (1) onderzoek naar de oorzaken van schade na vriezen en dooien van menselijke eicellen en embryo's door middel van fundamenteel cryobiologisch onderzoek; (2) onderzoek naar de gevolgen van celverlies voor de ontwikkelingscapaciteit van ontdooide embryo's (toxiciteit van de beschadigde blastomeren; hindering van de beschadigde blastomeren voor een normale ruimtelijke ordening binnen het zich ontwikkelende embryo) en (3) ontwikkelen van geoptimaliseerde vitrificatietechnieken voor het bewaren van eicellen en embryo's van de mens.

Vitrificatie betekent de complete verglazing van een oplossing bij snel afkoelen tot bijvoorbeeld -196°C . Vitrificatie protocollen die zeer robuust zijn (om variabiliteit in resultaten tussen centra en binnen centra te vermijden) moeten ontwikkeld worden.

Daarom zullen we fundamenteel en toegepast onderzoek uitvoeren met als doel de ontwikkeling van efficiënte, reproduceerbare en veilige vitrificatietechnieken voor verschillende stadia van eicellen en embryo's van de mens.

7. Pre-implantatie genetische diagnose: de ontwikkeling en validatie van diagnostische genetische testen

Pre-implantatie genetische diagnose (PGD) is een alternatief voor prenatale diagnose. PGD is een optie voor koppels die belast zijn met een hoog risico op kinderen met een erfelijke ziekte en die zwangerschapsafbreking willen vermijden om religieuze of persoonlijke overtuiging. De genetische test wordt in het Centrum voor Medische Genetica uitgevoerd op één of twee cellen, weggenomen uit pre-implantatie embryo's (verkregen na in-vitro bevruchting) van drie dagen oud. Op dag 5 worden uitsluitend embryo's niet aangedaan voor de onderzochte ziekte teruggeplaatst in de baarmoeder. De genetische testen dienen efficiënt en accuraat te zijn en bovendien aangepast voor uitvoering op één enkele cel.

Om de technische en praktische aspecten van deze 'single-cell' testen verder te verbeteren alsook nieuwe testen te ontwikkelen en te valideren, gebruiken we soms cellen van embryo's afgestaan voor wetenschappelijk onderzoek.

8. Derivatie en cultuur van embryonale stamcellijnen: onderzoek naar de veiligheid van het gebruik van deze cellen voor stamceltherapie

Menselijke embryonale stamcellen worden gemaakt uit menselijke embryo's van ongeveer zes dagen oud, waarbij de embryo's zelf worden vernietigd. Deze stamcellen kunnen heel lang in een schaalpje in het laboratorium groeien in de primitieve vorm waarin ze aanwezig waren in het embryo, zodat zij een bron van nieuwe cellen blijven. Met de juiste prikkels kunnen zij uitgroeien tot om het even welk weefsel in het menselijk lichaam. Daarom zijn deze cellen van groot belang voor de geneeskunde, omdat ze bv. zouden kunnen gebruikt worden voor de behandeling van suikerziekte of de ziekte van Parkinson. Ze zouden ook in de farmaceutische industrie kunnen worden gebruikt om nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen en te testen, en zouden zo het aantal proefdieren dat nodig is bij geneesmiddelenonderzoek gevoelig verminderen.

Omdat elk embryo verschillend is, zullen ook alle embryonale stamcellijnen verschillend zijn. Dit wil bv. zeggen dat niet alle stamcellen bij een bepaalde patiënt met de ziekte van Parkinson kunnen worden toegediend als behandeling, zoals niet alle bloedgevers geschikt zijn voor alle patiënten die bloed moeten krijgen. Daarom is het belangrijk om een zo groot mogelijk aantal van deze cellijnen te bekommen, om de veiligheid van zoveel mogelijk genetisch verschillende lijnen na te gaan alvorens deze cellen daadwerkelijk in therapie worden gebruikt. Eén van de veiligheidsaspecten die we wensen te onderzoeken is de genetische stabiliteit van embryonale stamcellen: van embryonale stamcellen is het geweten dat ze, als ze lang in het laboratorium worden gekweekt, fouten in de chromosomen gaan vertonen. Deze fouten zouden een weerslag kunnen hebben wanneer deze stamcellen ooit bij patiënten zouden worden getransplanteerd.

9. De derivatie en cultuur van zieke embryonale stamcellijnen om de ziekte te bestuderen

Menselijke embryonale stamcellen (zie punt 8) zijn van belang voor het bestuderen van genetische aandoeningen omdat we stamcellen kunnen maken uit embryo's die zo'n ziekte dragen. We zijn vooral geïnteresseerd in ziekten die veroorzaakt worden door zgn. dynamische mutaties, bv. het fragiele X syndroom, myotone dystrofie, ook gekend als de ziekte van Steinert, en de ziekte van Huntington. Deze ziekten zijn gekenmerkt door een instabiel gen dat verandert over de tijd en waardoor ook het ziektebeeld bij de patiënt verandert. Verder zijn we ook geïnteresseerd in stamcellen met mucoviscidose, SMA en de ziekte van Duchenne (zie ook punt 10). Tenslotte hebben we ook als doel om stamcellen met andere genetische ziekten te maken, die dan door andere onderzoekers in binnen- en buitenland kunnen gebruikt worden om deze ziekten te onderzoeken.

Het onderzoek van stamcellen met een genetische mutatie zou ons helpen met het beter begrijpen van deze ziekten, en misschien zelfs om gerichte behandelingen zoals speciale geneesmiddelen te ontwikkelen.

10. De differentiatie van embryonale stamcellijnen met het oog op stamceltherapie

Embryonale stamcellen zouden ook kunnen gebruikt worden als therapie voor bv. suikerziekte (zie punt 8). Een ander voorbeeld is het behandelen van infertiliteit door het maken van zaadcellen uit embryonale stamcellen. Dit wordt inderdaad al met succes uitgevoerd bij muizen. Dit onderzoek sluit aan bij het onderzoek naar mannelijke onvruchtbaarheid (zie punt 2).

Een ander doel van ons onderzoek is om uit de stamcellijnen met een genetische ziekte (zie punt 9) weefsels te maken die door deze ziekten aangetast zijn. Zo willen we bv. longweefsel maken in het labo uit stamcellen met mucoviscidose, om zo de ontwikkeling van de ziekte te kunnen bestuderen en hopelijk ooit een behandeling te kunnen ontwikkelen. Hetzelfde geldt voor spierweefsel uit stamcellen aangetast door bv. de ziekte van Duchenne of de ziekte van Steinert.

11. Onderzoek omtrent de veiligheid van IVF technieken

De resultaten van de talrijke follow-up studies van kinderen geboren na IVF/ICSI geven aan dat deze technieken veilig zijn, zowel wat betreft de resultaten bij de geboorte als bij de verdere ontwikkeling van de kinderen. Desalniettemin blijft verder onderzoek aangewezen want niet alle risico's werden onderzocht. Uit studies bij schapen en runderen bleek dat de in-vitro cultuurmedia epigenetische verstoringen konden geven in de embryo's. Deze verstoringen liggen aan de basis van het 'Large Offspring Syndrome' (LOS) bij schapen en runderen, een syndroom dat wordt gekenmerkt door o.a. overgewicht. Bij muizen werd daarentegen een lager geboortegewicht gevonden. Hierna rees de vraag of de in-vitro cultuursystemen van de IVF technieken bij de mens ook een epigenetische verstoring teweegbrengen. In het onderzoek bestuderen we de aan- of afwezigheid van bepaalde epigenetische eiwitten, alsook bijzondere epigenetische kenmerken zoals DNA methylatie.