Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Vybrané faktory ovlivňující úspěšnost přenosu embryí po IVF

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Stanislava Pertoldová

Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph. D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vybrané faktory ovlivňující úspěšnost přenosu embryí po IVF" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1.dubna 2016 _____

Bc. Stanislava Pertoldová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph. D. za odborné vedení práce, věcné připomínky a podporu a RNDr. Lucii Zetové za vstřícnost při odborných konzultacích.

Vybrané faktory ovlivňující úspěšnost přenosu embryí po IVF

Souhrn

Asistovaná reprodukce je obor medicíny, který se zabývá léčbou neplodnosti.

K trvalému zvyšování úspěšnosti metod asistované reprodukce přispívá nejen neustále se zlepšující přístrojové vybavení laboratoří, ale i současné zavádění nových poznatků a zkušeností z experimentální embryologie v běžnou praxi.

Hlavním cílem této diplomové práce, bylo na základě dat a údajů běžně získaných při procesu mimotělního oplození, ověřit efekt vybraných faktorů na úspěšnost léčby. Zpracována byla data nasbíraná v průběhu roku 2015 v laboratoři asistované reprodukce na pracovišti GEST IVF s.r.o. v Praze.

V diplomové práci nebyly použity žádné osobní údaje pacientek v souladu se zákonem 296/2008Sb. Z výsledků byla jasně patrná závislost úspěšnosti léčby na věku pacientky a to u všech sledovaných parametrů. Jako zásadní se potvrdila hypotéza vzájemné závislosti kvality embrya na dalším vývoji embrya po přenosu. Naopak délka kultivace embryí se ve sledovaném období neprojevila jako důležitý parametr úspěšnosti. Stejně tak užití dnes běžně používaných kultivačních médií, nemělo výraznější dopad na výsledek léčby ve sledovaném období. Statistické výpočty též potvrdily překvapivě významný rozdíl při přenosu embryí ve stáří 72 hodin a 120 hodin u skupiny žen nad 35 let, kdy se jako výhodnější jeví přenos mladších embryí.

Klíčová slova: asistovaná reprodukce, kvalita oocytu, embryonální vývoj, fertilizace, semikontinuální monitoring, úspěšnost přenosu

Some factors influencing success of IVF-embryo transfer

Summary

Assisted reproduction is a field of medicine that deals with infertility tretment.
Ongoing improvements of laboratory technology as well as ongoing evolving scientific research within IVF research,including experimental embryology in routine practice is contributing in a steady improvement of success rates of assisted reproduction.
This thesis is primarily based on data and information provided by the laboratory of assisted reproduction of GEST IVF Ltd.clinic in Prague,which was collected during the year 2015. This data was analyzed and investigated to verify the effect of selected factors on the success of the treatment. In This thesis we have not used any personal data of patients in accordance with the legislation act.296/2008Sb.
The results show clear evidence between the treatment success rate and patients age within all evaluated parameters. The fundametal hypothesis of interdependence of embryo quality on the further development of the embryo after the transfer was comfirmed.
Conversely, the timeframe for embryo cultivation is not an important parameter of success. Commonly used cuture media also did not show a significant impact on treatment outcome.
Statistical calculations also confirmed surprisingly significant differences in embryo transfer after 72 hours development and 120 hours development for women ever 35 years. Transfers of younger embryos appears to be more convenient for women over 35 years.

Key words: assisted reproduction , quality of oocyte fertilization, embryo development, semicontinuous monitoring, success rates of the embryo transfer.

Obsah

1 Úvod **7**
2 Cíl práce **8**
3 Literární rešerše **9**
3.1 Problematika plodnosti 9
3.1.1 Dědičnost neplodnosti 10
3.1.2 Muži 11
3.1.3 Ženy 12
3.2 Mužské a ženské pohlavní buňky 14
3.2.1 Oocyt 14
3.2.2 Spermie 16
3.3 Fyziologie reprodukce 17
3.3.1 Ovariální cyklus ženy 19
3.3.2 Základní hormonální markery menstruačního cyklu 21
3.3.3 Ovariální stimulace před mimotělním oplozením 22
3.3.4 Význam klinické embryologie při léčbě neplodnosti. 22
3.4 Metody asistované reprodukce 23
3.4.1 Intrauterinní inseminace (IUI) 23
3.4.2 In vitro fertilizace (IVF) a embryotransfer (ET) 24
3.4.3 Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) 24
3.4.4 Preselekční intracytoplazmatická injekce spermie (PICSI) 25
3.4.5 Asistovaný hatching (AH) 26
3.4.6 Prodloužená kultivace 27
3.4.7 Monitorování vývoje embryí 28
3.4.8 Kultivační média 30
3.5 Výsledky asistované reprodukce 31
4 Materiál a metodika **33**
4.1 Zdroj dat pro analýzu 33
4.2 Odběr oocytů pro IVF a jejich laboratorní hodnocení. 33
4.3 Oplození, kultivace embryí a embryotransfer 34
4.4 Sledování vývoje embryí 35
4.5 Statistická analýza dat 36
5 Výsledky, analýza dat **38**
6 Diskuze **44**
6. Závěr **48**
7 Použitá literatura **50**
8 Přílohy **54**

1 Úvod

Metody asistované reprodukce jdou ruku v ruce s lidskou neplodností.

V současné době má problémy s plodností cca 10-20% párů ve fertilním věku. Neplodnost tedy není diagnóza jedince, ale vždy diagnóza páru.

Průkopníky asistované reprodukce byli britští vědci Patric Ch. Steptoe a Robert G. Edwards. V roce 2008 oslavilo „ první dítě ze zkumavky“ své třicáté narozeniny. Louise Brownová se narodila 25. července 1978 v Oldhamu ve Velké Británii. Spolu s Lousie Brownovou tak své třicetiny oslavila i samotná metoda IVF (In Vitro Fertilisation) a asistovaná reprodukce jako taková.

Metody asistované reprodukce jsou různé a za svou dnes již skoro čtyřicetiletou historii prošly samozřejmě vývojem. Základem těchto metod je práce s pohlavními buňkami mimo tělo. Název IVF vychází ze základního postupu, kdy dochází k mísení spermií a vajíček v umělém prostředí. Oplozená vajíčka se po stanovenou dobu kultivují a v určitém stádiu jsou vybrána některá pro embryotransfer. Dříve se z důvodů větší jistoty implantovalo více embryí, což vedlo k častému výskytu nežádoucích vícečetných těhotenství. Dnes je trend opačný, doporučuje se embryotransfer jednoho maximálně dvou embryí. Získaná embrya, která se nevyužijí v prvním IVF cyklu, je možné zamrazit v tekutém dusíku. Limit pro uchovávání embryí v tekutém dusíku nebyl doposud biologicky jednoznačně prokázán.
V běžném denním rytmu klinické laboratoře, nezbývá již čas na porovnávání a následné vyhodnocování jednotlivých běžně používaných laboratorních technik, a proto i z těchto důvodů vznikla tato práce.

2 Cíl práce

Cílem mé práce bylo zhodnotit v podmínkách komerční laboratoře asistované reprodukce vztah mezi kvalitou oocytů, kvalitou embryí v časných stádiích vývoje a úspěšností přenosu embryí příjemkyni.

Testována bude hypotéza přímé souvislosti vývoje embrya a úspěšnosti jeho přenosu příjemkyni, pomocí kontinuálního monitoringu. Mezi další sledované parametry bude zahrnut věk pacientky, délka kultivace, metoda oplození, provedení asistovaného hatchingu u přenášených embryí, počet přenášených embryí a vyhodnocena bude také úspěšnost dle použitých kultivačních médií.

Lidské gamety a zárodky nebyly v souvislosti se studií vystaveny manipulacím, které by nebyly běžně v laboratoři používány. V souladu se zákonem 296/2008Sb. nebyla použita žádná osobní data pacientek. Sběr dat probíhal v průběhu celého roku 2015.

3 Literární rešerše

3.1 Problematika plodnosti

Neplodnost svého nositele nijak neobtěžuje bolestmi nebo omezením života. Jedná se však o nenaplnění důležitého životního cíle (Trávník a Čech, 2011).

V 80 letech 20. století komise pro populaci Organizace spojených národů vyhlásila základní právo rodiny: „Mít tolik dětí, kolik si rodina přeje, mít tyto děti v době, kterou považuje za nejvhodnější. “ A přesto ve vyspělých zemích včetně České republiky zůstává v současné době přibližně 20-25 % párů nedobrovolně bezdětných. Z hrubého odhadu lze usuzovat, že z poloviny se na poruchách plodnosti podílí žena, ze 40 % muž a z 10 % oba současně (Ulčová-Gallová, 2006).

Podobně i Řežábek uvádí, že příčina neplodnosti je téměř stejně často na straně muže jako na straně ženy.

Neplodnost je vždy diagnózou páru, tedy konkrétního muže a konkrétní ženy. Za neplodný považujeme pár v případě, že nedojde k otěhotnění po jednom roce pravidelného nechráněného pohlavního styku (Řežábek, 2014).

Riziko neplodnosti je ovšem vyšší u žen s dlouhodobě nepravidelným menstruačním cyklem, s předchozími záněty, nebo po operaci cysty (Kubíček, 1996).

Pravděpodobnost otěhotnění ženy ve věku do 30 let, která má pravidelný pohlavní styk se zdravým mužem, je přibližně 20-25 % na jeden menstruační cyklus. Ve 35 letech je to přibližně 15 % a po té začne prudce klesat, takže ve 42 letech se blíží nule (Řežábek, 2014).

Fyziologická neplodnost nastává v období menopauzy. Ačkoliv průměrný věk při menopauze je 50 až 51 let, interval 95 % spolehlivosti je poměrně široký, a to 45 až 58 let. Biologický věk a reprodukční věk tedy spolu nemusí nutně souviset (Mardešič et al., 2013).

Termínem „infertilní“ nebo „sterilní“ označujeme pár, který nedosáhl otěhotnění partnerky po jednom roce styků bez používání kontraceptivních prostředků.
Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučuje tuto klasifikaci:

1. Primární sterilita: pár nikdy nedosáhl těhotenství
2. Sekundární sterilita: pár poté co dosáhl jednoho či více donošených těhotenství, nyní není schopný dosáhnout nového těhotenství.
3. Primární infertilita: pár dosáhl těhotenství, které nebylo donošeno
4. Sekundární infertilita: pár, který poté co dosáhl jednoho, nebo více donošených těhotenství, dosáhl těhotenství, které skončilo abortem.

Termín „subfertilita“ je užíván k označení reprodukčních potíží, které však nevylučují možnost dosáhnout otěhotnění (Kubíček, 1996).

S každým menstruačním cyklem přichází nová naděje na otěhotnění. Zároveň však každý měsíc žena stárne. Od 35 let věku ženy, začne naděje na otěhotnění výrazně klesat, po 42 letech věku se blíží nule. Zcela jistě je to dáno stárnutím vajíček, nikoliv dělohy. Po menopauze již žena nemůže otěhotnět vůbec, nebereme-li v úvahu přijetí darovaných oocytů (Řežábek, 2014).

3.1.1 Dědičnost neplodnosti

Lidská reprodukce pracuje v situaci velkého počtu chromozomálně vadných embryí.

U ženy ve věku 30 let je 30 % oocytů aneuploidních, ve věku 40 let již 55 %. Podíl vadných embryí je ještě vyšší, protože se sečtou poruchy oocytů, spermií a poruchy dokončení zracího dělení oocytu, které probíhá po oplození. Navíc může nastat problém při splynutí chromozomů ze spermie a oocytu (Mardešič et al., 2013).

Jen díky přírodní selekci životaschopných embryí, se většina dětí rodí zdravá. Velmi pravděpodobné, ale stále ještě ne zcela jisté je, že celosvětové snižování kvality spermatu souvisí se zvyšujícím se podílem sterility z mužských příčin.

V rámci asistované reprodukce vyvstává důležitá otázka, zda nepřenášíme naší léčbou riziko neplodnosti do další generace. Je jisté, že u neplodnosti z vnějších příčin (postinfekční tubární sterilita, vysoký věk, léčba cytostatiky apod.) se riziko neplodnosti pro potomstvo nezvyšuje.

Někteří muži s oligospermií mají mikrodelece na chromozomu Y, což s oligospermií souvisí. Synové těchto mužů budou samozřejmě toto riziko mít také. Stejně tak ženy se syndromem polycystických ovárií mají vyšší riziko, že jejich dcery budou mít obdobné obtíže. Žádný z uvedených důvodů však není důvodem k odmítnutí léčby (Řežábek, 2014).

V dnešní době se již běžně provádí tzv. preimplantační diagnostika embryí (PGD) u pacientů s rizikem přenosu vážných genetických onemocnění. Nemedicínské důvody by pro PGD neměly být akceptovány. Nemedicínské požadavky na volbu pohlaví jsou kontroverzní a PGD z těchto důvodů je ve většině zemí zakázána. Komplexní choroby, většina fyzických znaků, inteligence apod. jsou ovlivňovány řadou faktorů genetických a environmentálních. Již současné technologie dokážou mnohé z těchto faktorů analyzovat a s rozvojem nových technologií a dokonalejšími znalostmi lidského genomu jistě nebude v budoucnu problém najít embryo „ na objednávku“.

Rozvoj v této oblasti bude spojen s rozsáhlými etickými diskuzemi a nezbytná bude jasná legislativní úprava (Mardešič et al., 2013).

3.1.2 Muži

Na rozdíl od žen, věková hranice plodnosti mužů není omezená. Předpokladem neporušené plodnosti muže je zachované libido, schopnost erekce, přiměřená koitální aktivita a normální fertilizační potenciál spermií.

Předpokladem pro zachování libida u muže je adekvátní hladina testosteronu. Pokles hladin testosteronu je zřetelný od věkové hranice 50-55 let. Postupný pokles spermatogeneze, který je však spíše kvalitativní než kvantitativní se nezdá být zásadním faktorem věkem podmíněné subfertility (Mardešič et al., 2013).

Základním andrologickým vyšetřením je spermiogram a kvalita jeho provedení je zásadní pro další diagnostický a léčebný postup (Kubíček, 1996).

Jedná se o základní mikroskopické vyšetření mužské plodnosti, kde hodnotíme počet spermií na 1 ml ejakulátu, pohyblivost spermií, kvalitu pohybu, procentuální zastoupení tvarově normálních spermií, aglutinace, viskozitu a pH.

Minimální hodnoty spermiogramu, které lze vyhodnotit jako normální, stanovuje světová zdravotnická organizace WHO (World Health Organization). Referenční hodnoty pro vyšetření ejakulátu jsou vydávány v pravidelných intervalech, jsou revidovány a aktualizovány. Hodnoty se odvíjejí od skutečných výsledků plodných mužů. Na jaře roku 2010 bylo vydáno již páté vydání příručky „ WHO laboratorní příručka pro zkoumání a zpracování lidského spermatu“, které přineslo mnoho novinek a to především v pohledu na hodnocení výsledků vyšetření.

Vyšetření spermiogramu neznamená zařazení muže mezi plodné nebo neplodné. Parametry WHO představují celosvětový nástroj pro hodnocení mužské plodnosti a umožňují standardizované a srovnatelné hodnocení.

NORMOSPERMIOGRAM (údaje platné před rokem 2010 jsou uvedeny v závorkách)

Hodnota pH: 7, 2

Objem ejakulátu: 1, 5 ml (2 ml)

Koncentrace spermií: >= 15 milionů/ml (20 mil/ml)

Celkový počet pohyblivých spermií >= 40%

Progresivně pohyblivých spermií> = 32%

Morfologie spermií: > 4 % normálních forem (30%)

Převážná většina prací uveřejněných v posledních 20 letech prokázala snížení objemu ejakulátu v souvislosti s věkem (o 20 až 30 %), a to především u mužů starších 50 ti let. Stejné práce však neprokázaly závislost celkového počtu spermií v ejakulátu na věku. Spermie starších mužů však mají sníženou motilitu (o 3 až 37%) a nižší procento morfologicky normálních forem (o 4 až 22%). S věkem se zvyšuje i procento geneticky abnormálních spermií (Mardešič et al., 2013).

3.1.3 Ženy

Je dobře známou skutečností, že plodnost ženy s věkem klesá. Zatímco spermatogeneze u mužů probíhá až do vysokého věku, vznik a vývoj ženských pohlavních buněk se řídí zcela odlišnými pravidly. Věkem podmíněný pokles plodnosti je dán především zhoršující se kvalitou oocytů. Vyšetření pro neplodnost proto zahajujeme vždy s přihlédnutím k věku ženy (Mardešič et al., 2013).

Menstruační cyklus ženy je možno rozdělit do tří stádií:

1. folikulární fáze- období folikulárního růstu

2. období ovulace- konečné dozrání a uvolnění oocytu

3. luteální fáze- vytvořené corpus luteum secrenuje hormony, které umožňují implantaci.

Prostředí a denní světlo nepochybně ovlivňují menstruační rytmiku cyklu u mnoha živočišných druhů. Ovšem primáti a především člověk je nejvíce vzdálen od vlivu okolního prostředí. Proto ženy mohou rodit v průběhu celého roku a ovulační vzedmutí gonadotropinů se může vyskytnout kdykoliv ve dne i v noci, zatímco většina ostatních savců má určitá sezonní období plodnosti (Ferin et al., 1997).

Mardešič et al. (2013) uvádí, že indikace pro léčbu páru s poruchou plodnosti ze strany ženy metodou mimotělního oplodnění jsou následující:

1. tubární sterilita- neprůchodnost vejcovodů

2. sterilita při endometrioze – růst endometria mimo dělohu

3. imunologicky podmíněná sterilita

4. sterilita idiopatická- nevysvětlitelná

Teprve při vyloučení prvních tří příčin sterility, lze hovořit o skutečně nevysvětlitelné sterilitě.

5. sterilita vyžadující dárcovství oocytů

Tento léčebný postup může být aplikován ve zvláštních případech u žen se zachovanou ovariální funkcí, klasickou indikaci však představují pacientky bez funkčních ovárií.

Programy darování gamet a embryí jsou umožněny skutečností, že v rámci procesu asistované reprodukce je možné oddělit zárodečné buňky od těla člověka (ženy i muže). Dárcem (dárkyní) je podle definice osoba stojící mimo neplodný pár (Řežábek, 2014).

Mezi všeobecně známé klinické onemocnění žen, které negativně ovlivňuje plodnost a vývoj oocytu jako takového patří obezita. Zhoršuje morfologii a fertilizaci oocytů, zpomaluje jejich zrání a snižuje mitochondriální aktivitu (Dumesic et al., 2015).

Od prvního do posledního cyklu, které se opakují zhruba po 28 dnech, probíhají v ženském organismu každý měsíc změny na vaječníku, na sliznici děložní, v pochvě a v prsou. Vliv centrální nervové soustavy, která velmi citlivě vnímá podněty z okolí, je v regulační činnosti velmi podstatný. Jedná se o tzv. hypothalamo-hypofyzárně-ovariální osu. Hypotalamus prostřednictvím gonadotropin-releasing hormonu (GnRH, gonadoliberin) stimuluje gonadotropní sekreci hypofýzy. Luteinizační hormon (LH) a folikulostimulační hormon (FSH) indikují morfologické a sekreční změny v ovariu. Vývoj folikulu je doprovázen zvýšením sekrece estradiolu a aktivita corpus luteum se projevuje sekrecí progesteronu a estradiolu. Vaječníky patří mezi žlázy s vnitřní sekrecí. Vznikají zde pod vlivem hormonálních působků z nadřazených center hormony, mezi nimiž k nejdůležitějším patří estrogeny a gestageny a dozrávají zde oocyty. Folikulární tekutina obklopující uzrávající oocyt vytváří jeho prostředí a má význam při dalším mechanizmu vazeb.

Slouží však i jako prostředí pro spermie, které v období ovulace směřují z oblasti čípku děložního přes dutinu děložní do vejcovodů. Folikulární tekutina u lidí i zvířat vzniká jednak přestupem z krevní plazmy, ale také vlastní sekrecí v místě a v době dozrávání vajíčka. Změna složení vnitřního prostředí oocytu může změnit i jeho vlastnosti týkající se oplození. Některé výrazné změny v imunologických vlastnostech folikulární tekutiny souvisí s hormonální stimulací a s mikrometodami získávání vajíčka ze stimulovaných vaječníků. U pacientek v programech in vitro fertilizace, lze ve folikulární tekutině nalézt i buňky patřící imunitnímu systému. K těmto buňkám řadíme především makrofágy, monocyty a B a T-lymfocyty (Ulčová-Gallová, 2006).

V současnosti probíhající analýzy folikulární tekutiny pomocí hmotnostní spektrometrie prokazují více než 480 různých bílkovin zahrnutých ve zrání oocytů. Obsah určitých aminokyselin (např. argininu, glutamátu, izoleucinu, valinu) se liší ve zralých a nezralých folikulech a může být vodítkem k vytipování oocytů, které jsou schopny adekvátní embryogeneze (Dumesic et al., 2015).

3.2 Mužské a ženské pohlavní buňky

Každá buňka lidského těla obsahuje velké množství informací, z nichž pro svoji funkci využívá jen nepatrný zlomek. Nosičem těchto informací jsou tzv. chromozomy, které jsou uloženy po párech v jádru buňky a jejichž počet je pro každý živočišný druh charakteristický. Pro člověka je to 46, tedy 23 párů. Polovina této dědičné výbavy pochází od matky, polovina od otce. Takto vypadají všechny buňky lidského těla. Vyjímkou jsou zárodečné (neboli pohlavní) buňky- spermie a vajíčka. Jejich genetická výbava je poloviční, z každého páru chromozomů obsahují jen jeden, aby jejich splynutím vznikly opět buňky s plným chromozomálním počtem. Pohlaví jedince je určeno kombinací dvou ze 36 chromozomů, tzv. pohlavními chromozomy. Označujeme je X a Y. Dvojice XX charakterizuje ženu, XY muže. Je logické, že od matky může dítě zdědit jedině chromozom X. O pohlaví proto rozhoduje, zda od otce dostane X, nebo Y (Čekal a Šulc, 1992).

3.2.1 Oocyt

Oocyt je samičí pohlavní gameta. Primární oocyt vzniká z oogonií ve vaječníku. Sekundární oocyt vzniká z primárního oocytu v období puberty.

Vývoj probíhá ve folikulech. Ve fetálním ovariu se odehrává podstatná část oogeneze, která je však ještě před narozením přerušena a oocyty zůstávají až do náboru příslušné skupiny folikulů v blokovaném stavu. Profáze I. zracího dělení primárního oocytu tedy proběhne až do diplotenního stádia, v němž se na dlouhou dobu zastaví a pokračuje až s nástupem puberty. Přerušení prvního zracího dělení oocytů je způsobeno inhibičním faktorem OMI (Oocyte Maturation Inhibitor), produkovaném folikulárními buňkami. Počet primordiálních folikulů při narození kolísá od 700 000 do 2 miliónů. Zrání pokračuje až do vytvoření folikulů s dutinou zvanou antrum (antrální folikuly). K úplnému dozrání v Graafův zralý folikul nedojde, neboť se neuplatní působení luteinizačního hormonu hypofýzy LH a folikuly zanikají procesem zvaným atrézie. Do puberty zaniknou všechny folikuly, které začaly předčasně zrát. Počet primordiálních folikulů se tak značně sníží na 300 000-400 000. V pubertě, která se ohlásí u dívek nástupem menstruace se začnou působením hormonů projevovat cyklické histologické změny v ovariu- tzv. ovulační cyklus a v děložní sliznici- tzv. menstruační cyklus. Nastává tedy období růstu a zrání folikulů a primordiální folikul se přeměňuje ve folikul primární. Později vznikne mezi folikulárními buňkami dutina zvaná antrum a hovoříme o folikulu sekundárním. Ten je označován též jako Graafův folikul.

Společným působením vyššího tlaku folikulární tekutiny a kontrakcemi svalových buněk, dochází k protržení stěny folikulu a k vyplavení oocytu na povrch ovaria. Tento děj se nazývá ovulace (Vacek, 2006).

Ovulovaný lidský oocyt je obklopen tzv. kumulem (cumullus oophorus). Jedná se o shluk buněk, které jsou vydatným zdrojem progesteronu. Zjednodušeně se dá říci, že jednotlivá spermie najde ve vejcovodu oocyt podle narůstajících koncentrací progesteronu produkovaného z cumullus oophorus (Petr, 2011). Jeho bezprostředním obalem je zona pellucida, mezi níž a cytoplazmatickou membránou oocytu je prostor zvaný perivitelinní. V průběhu jaderného zrání se v oocytu nachází první i druhé pólové tělísko. Oocyt má čirou cytoplazmu, v ní je přítomna haploidní sada chromozomů v metafázi II. Dále obsahuje cytoskelet, asi 100 000 mitochondrií, tvořících často komplexy s tubuly hladkého endoplazmatického retikula. Přítomny jsou váčky hladkého endoplazmatického retikula, Golgiho aparát a vrstva kortikálních granul, rozmístěných pod cytoplazmatickou membránou.

Lidský oocyt neobsahuje žádné zásobní lipidy ani sacharidy, je vyživován difuzí z okolí. Jako zdroj energie mu slouží zejména pyruvát (Trávník a Čech, 2011).

Kvalita oocytu klesá s postupujícím věkem ženy, takže kolem věku 40 let je podíl oocytů schopných po oplození dalšího vývoje minimální. V asistované reprodukci k tomu ještě přistupuje problematika zralosti. Při stimulaci ovárií nedosahuje celá populace oocytů stejného stupně dozrání. Pouze oocyty, které jsou v době odběru (punkce) v metafázi II, případně dokončují 1. zrací dělení, jsou schopny oplození a dalšího vývoje (Patrizio et al., 2003).

Hodnocení zralosti oocytu:

Zralost oocytu můžeme orientačně posuzovat v komplexu kumulus-oocyt, jak je získán při punkci a podrobně po denudaci – odstranění kumulárních buněk a mezibuněčné matrix kombinovaným působením hyaluronidázy a mechanického čištění (příprava k ICSI).

Pokud hodnotíme zralost komplexu kumulus-oocyt (v tomto stavu se používá ke klasické IVF), vycházíme především ze vzhledu kumulu. Velký, expandovaný, průhledný a tažný kumus svědčí pro to, že oocyt v něm obsažený je s velkou pravděpodobností v metafázi II. Zracího dělení. Naopak malý, hutný kumulus signalizuje nezralost komplexu, oocyt je pravděpodobně ve stádiu zárodečného váčku. Vyhodnocení denudovaného oocytu umožňuje přesnou klasifikaci. Zralý oocyt v metafázi II obsahuje pod zona pellucida první pólové tělísko, prostor mezi oocytem a zonou je volnější, cytoplazma neobsahuje jádro. Oocyt v metafázi I. neobsahuje pólové tělísko, štěrbina mezi oocytem a zonou je úzká. Oocyt ve

stádiu zárodečného váčku obsahuje zřetelné buněčné jádro a pod zona pellucida není přítomno pólové tělísko.

Kvalitní oocyt má kulovitý tvar, je obklopen pravidelnou zona pellucida, neobsahuje vakuoly (jejich přítomnost svědčí pro autolytické procesy) ani shluky pigmentu (svědčí pro apoptózu probíhající v atretických folikulech). První pólové tělísko má být celistvé, nefragmentované. V polarizačním mikroskopu by mělo být zřetelně patrné kompaktní dělící vřeténko (Gardner et al., 2004).

Žáková (2014) uvádí, že oocyt v metafázi II je definován jako oocyt s jasnou, jemně zrnitou cytoplazmou, malým perivitelinním prostorem a s jasnou, bezbarvou zona pellucida.
Morfologické hodnocení komplexu oocyt-cumulus oophorus se dělí na 4 typy:
1.typ : buňky kumulu jsou velké, rovnoměrně rozprostřené kolem oocytu. Oocyt má vyvinuté první pólové tělísko, které však často nemusí být přístupné pozorování. Komplex oocyt-cumulus oophorus tohoto typu je vhodný k oplozování po preinkubaci po dobu 2-6 hodin.

2. typ: buňky kumulu mají průměrnou velikost, jsou v kumulu rovnoměrně rozptýleny. Oocyt nemá vyvinuté pólové tělísko. Preinkubační doba pro tento typ je 6-12 hodin.

3. typ: kumulus a korona obklopující zonu pellucidu sestávají z hustě nahloučených buněk. Oocyt nemá pólové tělísko. Vhodná preinkubační doba je 12-24 hodin.

4. typ: kumulus s koronou je malý, tvořený pouze několika málo vrstvami buněk. Oocyt nemá vyvinuté pólové tělísko, v oocytu je zpravidla patrný zárodečný váček (jádro). Tyto oocyty by měly být z oplozování vyloučeny.

3.2.2 Spermie

Mužské pohlavní buňky vznikají v milionových kvantech. Jejich schopnost množení je tak velká, že zásoby spermií nemohou být vyčerpány (Čekal a Šulc, 1992).

Celý proces tvorby spermie (spermatogonie typu A, typu B, primární spermatocyty, sekundární spermatocyty, spermatidy, spermie) trvá 74 dní a je závislá na správných hladinách gonadotropinů a androgenů (Řežábek, 2014).

Spermie tedy vzniká v průběhu spermatogeneze ve stočených kanálcích varlete. Jejich tvorba je řízena sekrecí gonadotropních hormonů a pro spermiogenezi je nezbytná vysoká lokální koncentrace testosteronu, zajišťovaná intersticiálními Leydigovými buňkami. V průběhu meiozy se redukuje počet chromozomů ve spermiích na haploidní (23), každá spermie obsahuje jeden heterochromozom, buďto X, nebo Y.

Spermie se skládají z hlavičky, krčku a bičíku. Hlavička nese na přední části akrozom, tedy váček s enzymy nutnými k proniknutí do vajíčka. Krček spermie obsahuje mitochondrie a glykolytické enzymy a umožňuje pohyb bičíku. Bičík krouživě vlnivým pohybem pohání spermii dopředu.

Stavba těla spermie je tedy přizpůsobena jednak pohybu, ale také průniku obaly vajíčka. Vyvinutá spermie musí být schopna aktivně proniknout zátkou cervikálního hlenu, vycestovat děložní dutinou do vejcovodu, projít kumulem, navázat se na receptory zona pellucida, proniknout přes ni do perivitelinního prostoru, navázat se svým ekvatoriálním segmentem na oolemu a proniknout do oocytu (Trávník a Čech, 2011).

Mimo základní vyšetření kvality ejakulátu tzv. spermiogram, který byl popsán v kapitole 3. 1. 2., existují ještě další doplňková vyšetření, které nám říkají něco víc o oplozovacích schopnostech spermií. Mezi nejdůležitější funkční testy řadíme vyšetření na akrozomální reakci, testy na protilátky proti spermiím, testy vazby spermií na zonu pellucidu apod.

Akrozomální reakce je exocytóza akrozomálního obsahu, lytických enzymů, které umožní spermii proniknout kumulo-oocytárním komplexem bezprostředně před vlastní fertilizací oocytu.

Stanovení protilátek proti spermiím, je jedním z nejčastějších nadstandardních vyšetření. Přítomnost protilátek v séru resp. v prostředí fertilizace totiž snižuje migrační schopnost spermií (vznik aglutinací) a zejména úspěšnost vazby gamet.

Funkční testy spermií jsou využitelné zejména při testování fyziologické funkčnosti a vitality spermií. Mají však svou výpovědní hodnotu pouze jako statistický údaj pravděpodobnosti výskytu nebo funkčnosti sledovaného jevu populace spermií v ejakulátu (Mardešič et al., 2013).

3.3 Fyziologie reprodukce

Pro otěhotnění je nezbytné spojení spermie a vajíčka. Jak spermie, tak vajíčko obsahují vždy 23 chromozomů, tedy jednu polovinu z počtu, který je ve všech ostatních buňkách člověka. Po průniku spermie do vajíčka dochází ke splynutí chromozomální výbavy a vzniká zygota, která již obsahuje 46 chromozomů, neboli 23 párů, tedy plný diploidní počet (Řežábek, 2014).

Při vyvrcholení pohlavního aktu dochází k ejakulaci, kdy miliony spermií, smíchané s výživnou a ochrannou tekutinou z prostaty, jsou vystříknuty do pochvy. V pochvě je za

běžných okolností kyselé prostředí, které je určitou ochranou proti infekci. Ale pro spermie není příznivé a i přes ochranné působení zásadité prostatické tekutiny zde podstatná část spermií odumírá. Zbylé spermie postupují hrdlem děložním do dělohy. V děloze musí překonat několik centimetrů dlouhou, vysokou sliznici a najít ústí vejcovodu. Celá cesta trvá obvykle několik hodin a kromě aktivního pohybu spermií se na jejím uskutečnění podílí řada mechanismů (Čekal a Šulc, 1992).

Transport spermie je tedy ovlivněn mnoha faktory. Zásadní jsou fyzikální vlastnosti cervikálního hlenu. Zhruba uprostřed cyklu je ho velké množství, je tekutý s neutrálním pH. Poskytuje pro spermie vhodné prostředí a usnadňuje pasáž spermií do děložní dutiny.

Mechanická interakce cervixu a dělohy během orgazmu, způsobuje kontrakce dělohy, které jsou zřejmě ovlivněny velkým množstvím prostaglandinů, přítomných v ejakulátu.

V průběhu transportu ženským genitálem dochází ke kapacitaci spermií. Dochází ke ztrátě některých povrchových proteinů, které spermie získaly ještě v mužském genitálním traktu. U některých živočišných druhů je tento proces základním požadavkem pro fertilizaci. O potřebě nebo stupni kapacitace u člověka probíhají stálé diskuze, vzhledem k tomu, že fertilizace lidského vejce může být dosaženo in vitro spermií, která nebyla v kontaktu s genitálním traktem ženy (Ferin et al., 1997).

K oplození vajíčka, k vývoji časného embrya a k jeho implantaci dochází za normálních okolností v ženských pohlavních cestách. Implantace je skutečným okamžikem vzniku gravidity, protože za ideálních podmínek u zdravých partnerů vznikne těhotenství jen ve 24-30 % exponovaných cyklů a většina selhání spadá do preimplantačního období, při implantaci pravděpodobnost pokračování těhotenství značně vzrůstá. Předpokladem oplození je setkání funkčně schopné spermie se zralým oocytem (Trávník a Čech, 2011).

Proces fertilizace je zahájen druhově specifickou vazbou spermie na zona pellucida. Zona pellucida je membrána, která brání polyspermii, iniciuje akrosomální reakci, mechanicky chrání oocyt a preimplantační embryo před nepříznivými vlivy okolí. Matrix lidské zona pellucida je tvořena čtyřmi glykoproteiny, ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4. Kapacitovaná spermie s intaktním akrozomem se váže na proteiny ZP3 aZP4, které vyvolají akrosomální reakci. Spermie po akrosomální reakci se váže na ZP2, který vyvolává funkci sekundárního receptoru.

Akrosomální reakce zahrnuje mnohočetné fůze buněčné a zevní akrosomální membrány spermie, při nichž se odkryje vnitřní akrosomální membrána s navázaným obsahem. Proteolytický enzym akrosin se společně s mechanickou silou vyvinutou bičíkem spermie zúčastní na proniknutí spermie přes zona pellucida. Intaktní buněčná membrána

postakrosomálního segmentu splývá s buněčnou membránou oocytu a spermie je postupně vpravována do oocytu (internalizace spermie). Průniku dalších spermií brání tak zvaný blok proti polyspermii. U lidského vajíčka je zajištěn na úrovni zona pellucida a oolemy. Je způsoben kortikální reakcí. Po vstupu spermie se od místa penetrace šíří v kruzích vlna, v níž jsou uvolňována kortikální granula. Reakce je ukončena v několika minutách. Obsah kortikálních granul modifikuje strukturu zona pellucida, která ztrácí schopnost vázat další spermie. Průnik spermie vyvolá zvýšení koncentrace kalciových iontů v cytoplazmě vajíčka. Tyto události aktivují další vývoj. Jeho prvním projevem je prakticky současně s kortikální reakcí zahájené druhé zrací dělení, při němž se vytvoří druhé pólové tělísko a ve vajíčku zůstane haploidní počet chromozomů složených z jedné chromatidy (Trávník a Čech, 2011).

Výsledkem aktivace oocytu jsou mužské a ženské haploidní jádra tzv. prvojádra. V pronukleu dochází k duplikaci chromozomů. Obě prvojádra se spojují a jejich chromozomy si vyměňují genetický materiál pro první mitotické dělení. Rozdělení do dvoubuněčného stadia nastává asi 22-28 hodin po penetraci zona pellucida.

Oplozené vejce sestupuje vejcovodem. Čtvrtý den po ovulaci produkt početí, nyní ve stádiu blastocysty, vstupuje do dělohy (Ferin et al., 1997).

Pravděpodobně nejdůležitější signální molekulou je choriový gonadotropin (hCG), který blastocysta prokazatelně secernuje od 7. dne po oplození. Lidská preimplantační blastocysta produkuje rovněž prostaglandiny, které se mohou podílet na komunikaci blastocysty s endometriem (Trávník, 2011).

3.3.1 Ovariální cyklus ženy

Hlavní funkcí ovárií je tvorba zralých a oplozeníschopných oocytů. Celý reprodukční proces je cyklickou sekvencí událostí probíhajících v určitém pořadí. Tyto cyklické změny jsou výsledkem pozoruhodné koordinace mezi hormonální sekrecí a morfologickými změnami v různých orgánech ženy (Ferin et al., 1997).

Ovariální cyklus zahrnuje růst a zrání folikulu s následnou ovulací. S ovariálním cyklem úzce souvisí cyklus uterinní. Ten zahrnuje změny výšky a charakteru děložní sliznice, jako cílové tkáně ovariálních steroidů. Nejčastější příčinou problémů s otěhotněním na straně ženy je oligo- či anovulace. Normální růst folikulu s následnou ovulací vyžaduje bezchybné fungování hypothamalo-hypofyzo-ovariální osy (Mardešič et al., 2013).

Estradiol a progesteron, ovlivňují genitální systém různým způsobem, proto dochází v průběhu menstruačního cyklu k významným cyklickým morfologickým a fyziologickým

změnám. V děloze, endometrálních žlázkách a poševním epitelu jsou tyto změny dobře charakterizovány na rozdíl od změn ve vejcovodech.

Vejcovod:

Epitelový povrch vejcovodu je tvořen z několika buněčných typů. Mezi nimi jsou sekreční buňky bez řasinek a buňky řasinkové. Ve folikulární fázi oba typy buněk zvyšují svou výšku, která je maximální v období ovulace.

Endometrium:

Endometrium je sliznice pokrývající děložní dutinu. Zde působí progesteron na přeměnu proliferační fáze ve fázi sekreční a připravuje tak děložní sliznici na implantaci oplozeného vajíčka (Vacek, 2006).

Ovariální cyklus ženy lze rozdělit na fázi folikulární a luteální. Pokud nedojde v posledních dnech luteální fáze k implantaci, nastává menstruační fáze s odloučením děložní sliznice.

Folikulární fáze:

V časné folikulární fázi je ovariální aktivita nízká. Epitel je tenký, žlázky jsou krátké a úzké. V dalším průběhu se endometrium ocitá pod dominantním vlivem estradiolu. Výsledkem je proliferační fáze, sliznice se ztlušťuje. Na konci folikulární fáze, v období maximální sekrece estradiolu žlázky rychle rostou a stávají se vyvinuté.

Luteální fáze:

První dva dny po ovulaci se objevují v morfologii endometria jen malé změny. V tomto období se tvoří corpus luteum. Po jeho dozrání nastává v endometriu sekreční fáze. Vrchol sekrece nastává 6-7 den luteální fáze cyklu. Zvětšuje se množství sekreční tekutiny, která hraje důležitou roli při podpoře změn předcházejících implantaci a v časných stádiích vývoje embrya.

Menstruace:

Nedojde- li v posledních dnech luteální fáze k implantaci, nastává dramatický pokles sekrece estradiolu a progesteronu. Následkem tohoto hormonálního spádu podléhá endometrium postupným nekrotickým změnám, které vedou k odloučení všech buněk mimo

těch, které vystýlají hlubiny tubulárních žlázek. Nekróza a odlučování malých cévek má za následek menstruační krvácení (Ferin et al., 1997).

3.3.2 Základní hormonální markery menstruačního cyklu

Menstruační cyklus je charakterizován čtyřmi hlavními hormonálními markery.

LH (luteinizační hormon) a FSH (folikulostimulační hormon) jsou dva hypofyzární hormony, estradiol a progesteron jsou ovariálního původu.

Mardešič et al. (2013) vysvětluje tzv. teorii dvou hormonů (LH a FSH) a dvou buněk (buňky theky a buňky granulozy, tvoří vnější a vnitřní vrstvu buněk kolem vyvíjejícího se folikulu.)

Jedná se o vzájemné ovlivňování buněk théky a LH receptorů a buněk granulozy a FSH receptorů.

V sekreci LH je nejnápadnější událostí náhlý vzestup a pokles jeho koncentrace na konci folikulární fáze. Tzv. LH peak. Průměrné trvání tohoto vzestupu je 48 hodin.

Pečlivým porovnáním hormonálních hladin s ultrazvukovým pozorováním vývoje ovariálního folikulu byla určena pravděpodobná doba ovulace, ke které dochází okolo 18 hodin po vrcholu křivky, nebo 36 hodin od začátku předovulačního vzestupu LH. V jiných fázích menstruačního cyklu k nápadnějším změnám sekrece LH nedochází.

FSH stoupá také na konci folikulární fáze, jeho vzestup je však nižší než je tomu u LH.

Mnohem důležitější je nízké, avšak fyziologicky velmi zřetelné zvýšení hladiny FSH (okolo dvojnásobku) v den předcházející menstruaci, nebo v den menstruace.

Tento tzv. časný folikulární vzestup FSH se objevuje přibližně za 24 hodin po začátku menstruace. Pouze v tomto období menstruačního cyklu je poměr koncentrací FSH:LH ve prospěch FSH.

Sekrece estradiolu zůstává v průběhu časné folikulární fáze nízká, zvyšuje se však první týden před středocyklovým vyplavením hladin gonadotropinů. Tento vzestup estradiolu je nejprve mírný, pak se prudce zrychluje a dosahuje vrcholu v období začátku vzestupu LH. K jeho opětovnému vzestupu pak dochází po vytvoření corpus luteum.

Sekrece progesteronu je v průběhu folikulární fáze na velmi nízké úrovni. Stoupá náhle 12 hodin před začátkem vzestupu hladin LH. Stoupat začne opět 36 hodin po začátku vzestupu LH. V průběhu luteální fáze hladiny obou hormonů (estradiol, progesteron) stoupají a dosahují maxima 6-9 dnů po středocyklovém vzedmutí gonadotropinů.

Vedle těchto denních hormonálních rytmů, které tvoří základ 28 denního menstruačního cyklu, jsou důležité i ultradiánní (kratší než den) změny hormonálních hladin (Ulčová-Gallová, 2006).

Menstruační cyklus je výsledkem přesné koordinace událostí, na kterých se podílí celý reprodukční systém (Ferin et al., 1997).

3.3.3 Ovariální stimulace před mimotělním oplozením

Předpokladem asistované reprodukce je získat ne jeden, ale více oocytů najednou, abychom zvýšili šance na úspěšnou léčbu, a k tomu nám slouží léky, které zvyšují hladinu FSH v krvi. (Řežábek, 2014)

Moderní stimulační protokoly představují komplexní manipulaci s hypotalamo-hypofyzo- ovariální osou. Multifolikulární odpověď ovária je zajištěna stimulací gonadotropiny, kvalita získaných oocytů však závisí na úrovni kontroly sekrece LH hypofýzou pomocí agonistů či antagonistů GnRH (gonadotropiny uvolňující hormon) (Mardešič et al., 2013).

Na základě výsledků mnoha studií je jasné, že GnRH řídí sekreci jak LH, tak i FSH. Rychlé vyplavení LH, které následuje po aplikaci GnRH, je doprovázeno i vyplavením FSH, i když v menší míře (Ferin et al., 1997).

V klinickém použití jsou stále gonadotropiny močového původu, většinu trhu však představují rekombinantní preparáty. S vývojem technologií se stále zvyšovala čistota, efektivita a bezpečnost jednotlivých preparátů. Tento vývoj pacientkám značně zjednodušuje ovariální stimulaci, a to nejprve možností subkutánní aplikace (oproti původní intramuskulární aplikaci), v současné době je běžná aplikace pomocí tzv. pera, která celou léčbu dále zjednodušuje (Mardešič et al., 2013).

3.3.4 Význam klinické embryologie při léčbě neplodnosti.

Individuální vývoj, čili ontogenezi člověka lze rozdělit na období prenatální a postnatální. Embryologie pojednává o vývoji prenatálním. Prenatální vývoj člověka začíná spojením mužské a ženské pohlavní buňky, neboli oplozením a končí porodem plodu (Vacek, 2006).

Experimentální embryologie dala základ novému zdravotnickému oboru, klinické embryologii. Klinická embryologie se zabývá aplikací poznatků z embryologie, genetiky a

dalších vědních oborů v asistované reprodukci. Jejím cílem je efektivní a bezpečné provedení metod asistované reprodukce kvalifikovanými pracovníky.

V posledních 30 letech došlo ke zvýraznění úlohy embryologie přímo v klinické praxi. Souvisí to jednak s obrovským rozvojem přístrojové techniky v medicíně a s tím, že byly opuštěny strnulé popisné metody dříve používané v embryologii, jednak s uplatněním metod kultivace buněk, tkání a embryí in vitro a zdokonalením genetických vyšetřovacích metod. To všechno umožnilo zavést mnoho nových diagnostických a léčebných postupů, které jsou založeny na embryologických poznatcích.

Embryologie člověka se tak stala stejným základem pro prenatální medicínu, jako jsou anatomie a fyziologie základem pro medicínu postnatální (Trávník a Čech, 2011).

Obor klinická embryologie existuje v České republice prakticky již 30 let. Klinická embryologie se zabývá diagnostickými a léčebnými výkony s lidskými zárodečnými buňkami a embryi, je náročná na kvalifikaci a na manuální zručnost pracovníků. Úzce spolupracuje s gynekology- reprodukčními specialisty při léčbě poruch plodnosti (Žáková, 2014).

3.4 Metody asistované reprodukce

Asistovaná reprodukce je obor medicíny, který pracuje mimo tělo člověka se spermiemi, vajíčky a embryi a to s cílem otěhotnění ženy. Většina postupů asistované reprodukce je určena k léčbě či prevenci patologického stavu neplodnosti, jen v oblasti skladování zárodečných buněk a preimplantační genetické diagnostiky asistovaná reprodukce léčbu neplodnosti přesahuje (Řežábek, 2014).

Zdaleka ne všechny neplodné páry potřebují léčbu metodami asistované reprodukce, naopak mnoho neplodných žen například otěhotní po jednoduché medikaci. Úspěchy metod asistované reprodukce, často medializované v tisku i v televizi, vzbuzují někdy falešný dojem dvojího druhu. Jednak že žena s jejich pomocí určitě a hned otěhotní a jednak že bez nich sterilitu vyléčit nelze. Ani jeden extrém není pravdivý, metody asistované reprodukce mají své indikace a podmínky, výhody i rizika (Řežábek, 2014).

3.4.1 Intrauterinní inseminace (IUI)

Intrauterinní inseminace je většinou metodou první volby u párů s nevysvětlitelnou poruchou plodnosti. Předpokladem intrauterinní inseminace je zpracování ejakulátu

v laboratoři a následně inseminace promytými kapacitovanými spermiemi do děložní dutiny co nejblíže okamžiku ovulace (Mardešič et al., 2013).

Jedná se o vnesení spermií do pohlavního ústrojí ženy. Konkrétně vstříknutí spermií do dělohy. Tato metoda je využívána u páru s lehce patologickým spermiogramem např. snížené procento pohyblivých spermií, nebo celkově zhoršená pohyblivost všech přítomných spermií v ejakulátu, nebo v případě impotence, anejakulace, vaginizmu apod. V tomto případě lze sperma předem zamrazit a následně dle menstruačního cyklu ženy použít k inseminaci. Zpracování spermatu provádíme dle předem stanoveného postupu, aby došlo k dokonalému vyčištění spermií a zbavení bakterií a seminální plazmy přítomné v ejakulátu. V jednom cyklu ženy lze provést i několik inseminací tzv. reinseminací.

Tato neinvazivní metoda je pacientkami využívána, ale vzhledem k její nižší úspěšnosti cca 10 %, se často jedná jen o poslední pokus před zahájením klasického cyklu IVF (Řežábek, 2014).

Mardešič et al. (2013) doporučují upustit od intrauterinní inseminace právě z důvodů nezvyšující se úspěšnosti na rozdíl od metody mimotělního oplození.

3.4.2 In vitro fertilizace (IVF) a embryotransfer (ET)

IVF je nejdůležitější metodou asistované reprodukce a její klasickou indikací je neprůchodnost vejcovodů. Jedná se o léčebnou metodu, při níž je vajíčko odebrané z hormonálně připravených vaječníků oplodněno v laboratorních podmínkách spermií a po krátkodobé kultivaci (3- 5 dnů) je embryo přeneseno do dělohy ženy. Lidská vajíčka se nejčastěji odebírají pochvou pod ultrazvukovou kontrolou a jejich získaný počet závisí na mnoha podmínkách (např. na typu použité hormonální stimulace, na reakci tkáně vaječníku pacientky, na načasování odběru a zpracování biologického materiálu) (Ulčová-Gallová, 2006).

IVF ET – in vitro fertilizace a embryotransfer je tedy odběr vajíčka, jeho laboratorní ošetření, kultivace se spermiemi, sledování vývoje a přenesení vzniklého embrya do dělohy. Často se užívá jen termín IVF a doplněk ET se považuje za samozřejmý (Řežábek, 2014).

3.4.3 Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI)

ICSI je mikromanipulační metoda, která byla zavedena v asistované reprodukci počátkem devadesátých let 20. století jako nástroj IVF u gamet se sníženým fertilizačním

potenciálem. Odborné veřejnosti byla tato metoda oficiálně představena v roce 1992. Použitelnost ICSI v asistované reprodukci byla potvrzena prvními dosaženými graviditami a následně zdravě narozenými jedinci (Mardešič et al., 2013).

Metoda ICSI se užívá, pokud se nachází v ejakulátu výrazně až extrémně snížený počet, nebo jsou spermie nekvalitní. Principem metody je zavedení jediné spermie pomocí mikromanipulátoru přímo do cytoplazmy oocytu (Rutarová et al., 2012).

Princip metody ICSI se až do dnešní doby zásadně nezměnil. V posledních letech jsou však vyvíjeny metody účinnější selekce spermií před vlastní ICSI. Jedná se především o metodu PICSI, která bude popsána v následující kapitole.

Spermie určené k oplozování jsou z ejakulátu separovány centrifugací přes gradient ve kterém jsou zachyceny nemotilní spermie, další buněčná příměs a seminální plazma. V případě velmi nízkých koncentrací spermií v ejakulátu, nebo astenospermii (při zhoršené pohyblivosti) je gradientová centrifugace vynechána a lze použít centrifugaci v médiu bez hustotního gradientu s cílem zvýšit koncentraci spermií ve výsledné suspenzi.

Oocyty získané punkcí folikulů po předchozí hormonální stimulaci pacientky jsou pomocí hyaluronidázy enzymaticky zbaveny folikulárních buněk (corony radiaty a cumulus oophorus) a zralost oocytu je zhodnocena podle přítomnosti pólového tělíska a kvality cytoplazmy.

Při provádění intracytoplazmatické injekce spermií bylo zjištěno, že mechanické narušení kontinuity cytoplazmatické membrány spermie je nezbytné pro úspěšnou fertilizaci a další vývoj zygoty. Látky, které se ze spermie uvolní, byly označeny jako sperm oocyte activating factor (SOF). Jedná se o specifickou fosfolipázu, která v interakci s látkami obsaženými v oocytu umožní vznikem oscilací koncentrace kalciových iontů jeho aktivaci. Intaktní spermie umístěná do cytoplazmy oocytu vývoj neumožní (Trávník a Čech 2011).

Metoda ICSI nezajišťuje samotnou fertilizaci oocytu, ale obchází přirozené molekulární a mechanické bariéry cervixu, dělohy, vejcovodu a kumulooocytárního komplexu, které musí spermie při spontánním oplození překonat pomocí motility (Řežábek, 2014).

3.4.4 Preselekční intracytoplazmatická injekce spermie (PICSI)

Jedná se o v současné době jedinou v klinické praxi použitelnou metodu oplození, při které dokážeme provést funkční test kvality spermií, aniž bychom spermie zbavili jejich oplozovacích schopností.

Při této metodě jsou spermie inkubovány v Petriho misce, jejíž dno je pokryté hyaluronanem. Pro intracytoplazmatickou injekci spermie do vajíčka jsou následně embryologem vybírány pouze spermie navázané na hyaluronan. Hyaluronan je mukopolysacharid, který se přirozeně vyskytuje jako součást mezibuněčné hmoty obklopující spolu s kumulárními buňkami vajíčko. Aby mohla spermie při přirozeném oplození úspěšně penetrovat a fertilizovat vajíčko, musí být schopna vázat se k hyaluronanu. Takové interakce je schopna pouze zralá spermie, která je k vazbě na hyaluronan biochemicky kompetentní. Vědeckými studiemi bylo potvrzeno, že spermie, které jsou schopny vazby k hyaluronanu, mají lepší morfologii, statisticky nižší podíl chromozomálních anomálií a lepší integritu DNA. Pokud tedy existuje podezření, že by se v ejakulátu muže spermie s takovými defekty mohly vyskytovat, bývá doporučeno oplození vajíček metodou PICSI (Žáková, 2014).
Vlastnosti hyaluronanu jsou podobné vlastnostem zona pellucida. Bylo prokázáno, že takto selektované spermie jsou životaschopnější. Paternální přínos těchto kvalitnějších spermií by měl vést ke snížení výskytu potratů (Žáková a kol.,2012).

Počáteční optimismus z nové metody preselekce založené na vazbě povrchového receptoru pro hyaluronan byl vystřídán ne zcela přesvědčivými výsledky srovnatelnými s klasickou selekcí před ICSI (Mardešič et al., 2013).

3.4.5 Asistovaný hatching (AH)

V přirozeném stavu se oplozený oocyt vyvíjí při transportu z vejcovodu do dělohy v pevném obalu. Ten je tvořen hlavně bílkovinnou slupkou (tzv. zona pellucida), která funguje především jako bílkovinná skořápka. Zamezuje průniku infekce do oocytu a drží dělící se buňky v kompaktním stavu. V době, kdy vajíčko docestuje do dělohy, musí tento obal opustit a uhnízdit se do prokrvené a na těhotenství připravené děložní sliznice. Děje se tak přirozeným tlakem rostoucích buněk. Mnohdy však k tomuto uhnízdění nedojde, pokud je zona pellucida příliš silná.

Asistovaný hatching je mikromanipulační technika, při které pomocí laseru, nebo mechanicky pomocí mikromanipulační jehly, dojde k narušení zona pellucida. Indikací k provedení asistovaného hatchingu je věk pacientky, opakované nedosažení těhotenství po transferu kvalitních embryí a v neposlední řadě to je na přání pacientky (Řežábek, 2014).

Asistovaný hatching zvyšuje implantační potenciál embrya nejen mechanicky, ale také tím, že dojde ke zprostředkování časnějšího kontaktu embrya s endometriem (Žáková et al., 2012).

3.4.6 Prodloužená kultivace

Od dob, kdy začala být metoda IVF používána, se postupně prodlužuje doba kultivace embryí. Tento pokrok byl podmíněn zavedením sekvenčních kultivačních médií, která svým složením odpovídají metabolickým potřebám embrya v jeho různých fázích vývoje.

Přenášet embryo ve stádiu blastocysty do dělohy je nejvýhodnější strategie při embryotransferu. Oproti zavádění časnějších vývojových fází, pro tuto cestu hovoří několik skutečností. V případě blastocysty transferujeme zralejší embryo, a to navíc v době, kdy je endometrium již dokonaleji připraveno pro jeho přijetí. Přibližujeme se totiž více implantačnímu oknu spojenému s produkcí rozličných endometriálních faktorů proteinové povahy, které podmiňují uterinní receptivitu charakterizovanou schopností dovolit nejen adhezi a invazi embrya, ale i jeho růst a vývoj. Navíc v době implantačního okna je škála těchto proteinů, pro jejichž uplatnění je nutný pokles estrogenových a progesteronových epiteliálních receptorů, pestřejší (Lessey, 2000).

Vytváříme tak příznivější předpoklady pro navázání kvalitní komunikace mezi trofoblastem embrya a epitelem endometria, která se projeví v procesu adheze a následné invaze embrya do děložní sliznice.

Zavedení embryí ve stadiu rýhování do dělohy s sebou přináší řadu nevýhod. Předčasné uložení embrya do dělohy může vyústit v signifikantní buněčný stres, který je následován poškozeným vývojem a ztrátou životaschopnosti embrya.

Nemáme možnost posoudit, zda embryo bude mít skutečně plnohodnotný vývojový potenciál, zatímco fáze blastocysty již zaručuje, že do funkce vstoupila vlastní embryonální kontrola genomu (Plachot et al., 2000).

Ve snaze redukovat vícečetná těhotenství a jeho rizika se postupně snižuje počet embryí určených k přenosu. Tento trend je spjat s potřebou vybrat embrya co nejkvalitnější, s předpokládanou dobrou životaschopností. Ta je spolehlivěji předvídána při dostatečně dlouhé kultivaci (Žáková a kol.,2012).

Uterinní kontrakce, které jsou silnější v den aspirace oocytů (den 0) a mohou způsobit vyloučení embrya a jeho ztrátu, klesají v den 4. I z tohoto důvodu je blastocystový transfer v den 5 kultivace bezpečnější (Fanchin,1998).

Jako výhody prodloužené kultivace do stádia blastocysty uvádí Tauwinklová (2000) například, překlenutí doby projevení se vývojového bloku mezi 4 až 8 buněčným stádiem,

embryo se dostává do dutiny děložní ve stejném vývojovém stádiu jako v přirozeném cyklu a napomáhá v reparačním procesu po mikromanipulačních procedurách.
Ovšem jak uvádí Chan (2000) , limitem pro dosažení fáze blastocysty jsou nejméně šesti buněčná embrya, ráno 3 den kultivace. Je tedy otázkou, zdali v některých případech nevolit den 3, jako den přenosu hůře se vyvíjejících embryí, nebo v případě zástavy vývoje embryí 4 nebo 5 den, ukončit cyklus bez přenosu.

Zajímavým problémem je prodloužená kultivace embryí do stádia blastocyst v závislosti na věku pacientky. Letterie a spol. popisují dosažení tohoto stádia při kultivaci embryí u 62 % pacientek i ve věku 36-42 let. Marek et al. (1999) uvádějí zvýšení „ pregnancy a implantation rates“ při zavádění blastocyst ve srovnání s časnějšími stádii vývoje embryí ve všech věkových kategoriích včetně žen nad 39 let. Na druhé straně Rodriquez uvádí, že s rostoucím věkem se nesnižuje počet získaných blastocyst, ale klesá „pregnancy rate“ (od 38 let věku) a „implantation rate“ (od 35 let) oproti skupině mladších pacientek.

Problém rostoucího věku ženy s sebou nese riziko již nižší reakce na ovariální stimulaci, nemá však vliv na morfologickou kvalitu vzniklých blastocyst. Signifikantně nižší „pregnancy a implantation rates“ jsou zapříčiněny chromozomálními abnormitami, které nejsou neslučitelné se vznikem blastocysty, ale jsou v rozporu s dalším embryonálním vývojem (Plachot et al., 2000).

3.4.7 Monitorování vývoje embryí

Kontrola vývoje embryí se provádí buď standartní metodou, vždy po 24 hodinách kultivace, nebo jinými dnes v praxi používanými metodami kontinuálního monitoringu.

Primovision systém je speciální zařízení umožňující kontinuální sledování vývoje embryí a pomáhá tak vybrat nejlepší embrya na transfer.

Zařízení se skládá z kamery, řídící počítačové jednotky a monitoru. Celý monitoring embryí probíhá v uzavřeném inkubátoru. Každých 15 minut snímá kamera embrya po dobu 5 sekund. Hodnocení embryí se provádí na základě analýzy digitálních záznamů, které pomáhají zachytit poruchy dělení buněk, fragmentaci, vakuoly apod. Je možné hodnotit dynamiku vývoje a umožňuje tak zvýšit šance na otěhotnění (Řežábek, 2014).

Metodou výběru embrya na základě kontinuálního monitorování a hodnocení jeho vývoje jsme významně zvýšili úspěšnost asistované reprodukce. Embrya s nepravidelným dělením mají limitovaný vývojový potenciál, mají četné chromozomální abnormality a neměla by být přenášena. Kontinuální hodnocení je objektivní, neboť podává přesné výsledky

dělení buněk dle daného časového harmonogramu. Technologie neinvazivního hodnocení lidských embryí in vitro však nejsou stále ještě všeobecně dostupné (Žáková et al., 2012).

Ovšem Zetová (2016) oponuje, že hodnocení embryí pomocí kontinuálního monitoringu je značně neobjektivní, jelikož neexistují závazná pravidla a hodnocení je tedy značně individuální.

Hlavním hlediskem při selekci embryí pro zavedení do dělohy zůstává stále jejich morfologie, pro její snadné a rychlé zhodnocení. I když se v literatuře objevují různé snahy o skórování kvality blastocyst a jsou známa určitá obecná kritéria, chybí jednotný, všeobecně přijímaný systém klasifikace jejich morfologie.

Protože jsou v systému hodnocení embryí a sledovaných parametrech velké rozdíly nejen v různých zemích, ale i mezi laboratořemi v rámci jedné země, sešli se zástupci mezinárodních společností Alpha Scientists in Reproductive Medicine a ESHRE Special Interest Group Embryology v roce 2011 v Istanbulu a zpracovali konsensus, který reprezentuje „ minimální standard“ pro skórování oocytů a embryí. Doporučují toto společné minimum popisného skórovacího systému pro všechny laboratoře. „ Timing“ sledování vývoje embrya je uveden v tabulce č. 1.

Optimální morfologie oocytu: sférická struktura obalena zona pellucida, průsvitná cytoplazma bez inkluzí, vyčleněné pólové tělísko. Oocyt s abnormálně velkým pólovým tělískem, by neměl být oplozován, neboť je pravděpodobné riziko aneuploidie oocytu. Velké vakuoly obvykle vedou k selhání fertilizace.

Optimálně fertilizovaný oocyt: sférický, má dvě pólová tělíska se dvěma centrálně umístěnými, stejně velkými prvojádry. Prvojádra by měla mít stejný počet a velikost jadérek. Prvojádra jsou hodnocena jako symetrická, nesymetrická a abnormální.

Dělící se embrya: dle „ Consensu“ embrya, která se dělí rychleji nebo později než je očekávaný interval, mají redukovaný implantační potenciál. Fragmentace je u dělících se embryí definována jako střední (do 10 %), přiměřená (10 -20%) a těžká (více jak 25 %). Multinukleace (přítomnost více jak jednoho jádra v blastomeře) souvisí se sníženým implantačním potenciálem embrya. Stejná velikost blastomer je důležitá od 2 do 8 buněčného stádia. Ve všech dalších stádiích je nepravidelnost blastomer spojena s různou fází dělení. Další morfologické znaky, které se hodnotí, jsou granulace cytoplazmy, vzhled membrán, přítomnost vakuol. Důležité je trojrozměrné rozvrstvení buněk v embryu.

Morula: Optimálně by dělící se embryo mělo být v době 92 hodiny ve stádiu moruly. Mělo by být kompaktující, nebo kompaktované po celém povrchu. Horší prognózu mají moruly s některými buňkami vyloučenými mimo povrch.

Blastocysta: Optimálně by měla být úplně expandovaná s rozpoznatelnými buňkami k sobě těsně přiléhajícími a s trofektodermem, který je tvořený množstvím buněk, které formují kompaktní epitelium (Blaban et al., 2011).

Tabulka č. 1: Sledování fertilizovaného oocytu a optimálního embryonálního vývoje dle Istanbulského consensu

Typ hodnocení	Čas po inseminaci (hod)	Očekávané vývojové stádium
Kontrola fertilizace	17 ± 1	stádium prvojader (PN)
Kontrola syngamie	23 ± 1	50% stadium syngamie, více než 20%- 2 buněčné
Časné rýhování	26 ± 1 po ICSI 28 ± po IVF	2 buněčné stádium
Embryo den 2	44 ± 1	4 buněčné stádium
Embryo den 3	68 ± 1	8 buněčné stádium
Embryo den 4	92 ± 2	Morula
Embryo den 5	116 ± 2	Blastocysta

Přestože tyto tradiční systémy hodnocení morfologie zárodečných buněk a embryí dosáhly již svého limitu při výběru optimálního embrya pro přenos, zůstávají pro embryology stále užitečným nástrojem. Pro pokrok v této oblasti je však žádoucí a nezbytné, abychom dostávali stále více informací o morfologické kvalitě, ale i o fyziologické aktivitě jednotlivých embryí (Žáková, 2014).

3.4.8 Kultivační média

Na rozdíl od raných začátků IVF, kdy se v domácích podmínkách vyráběla kultivační média pro embrya pouze jako solné roztoky, dnes je na trhu k dispozici široké spektrum komerčních kultivačních médií. Složení současných kultivačních roztoků, které obsahují až 80 komponent včetně solí, zdrojů energie (lidský oocyt neobsahuje žádné zásobní lipidy ani sacharidy), proteinů, antibiotik, aminokyselin, vitamínů a růstových faktorů, má zajistit správné prostředí pro optimální vývoj embrya in vitro (Žáková, 2014).

V průběhu kultivace se nároky embrya na přísun energie a živin mění a stejně tak i názory na použití sekvenčních médií, které zohledňují jiné nároky embrya do třetího dne kultivace a od třetího do pátého dne kultivace (Řežábek, 2014).

Jak uvádí Tauwinklová (2000) medium určené pro kultivaci do 72 hodin po oplození obsahuje stejné hladiny výživných látek, jako jsou obsaženy ve vejcovodech. Na rozdíl od média učeného ke kultivaci od 72 hodin do 120 hodin, které je založeno na takovém obsahu hladin glycidů jako v děloze a obsahuje esenciální a neesenciální aminokyseliny k povzbuzení vývoje blastocysty a procesu diferenciace.

3.5 Výsledky asistované reprodukce

Hodnocení výsledků léčby neplodnosti je nezbytné provádět zvlášť pro standardní skupinu žen do 35 let věku a pro ženy starší. Nad 35 let totiž pravděpodobnost otěhotnění přirozeně postupně klesá k nule a výsledky v této skupině nejsou tedy odrazem kvality práce lékařů.

Průměrná pravděpodobnost otěhotnění zdravé ženy věku do 35 let, která má pravidelný nechráněný pohlavní styk se zdravým mužem je 16%, žena tedy v průměru otěhotní za 6 menstruačních cyklů. Efektivitu léčby asistovanou reprodukcí je nutno vždy vidět ve vztahu k přirozené naději na těhotenství u člověka (Řežábek, 2014).

Embrya, ať již vstupující do dělohy přirozeně vejcovodem, nebo transferována katetrem, nidují nezávisle- podle pravidel matematické kombinatoriky. Vždy platí, že po vnesení dvou embryí do dělohy bude pravděpodobnost otěhotnění ženy vyšší než při vnesení pouze jednoho.

V současné době je ovšem tlak pojišťoven na přenos pouze jednoho embrya a to z důvodu prokazatelně zvýšeného rizika nedonošených dvojčat vzniklých metodami mimotělního oplození (Mardešič et al., 20113).

Ukazateli efektivity léčby metodami asistované reprodukce jsou především „implantation rate a pregnancy rate“.

„Implantation rate“ je definován jako podíl počtu plodových vajec a počtu transferovaných embryí. Automaticky zohledňuje transfer několika embryí a je nejlepším parametrem umožňujícím srovnání metod, nebo pracovišť.

„Pregnancy rate“ vyjadřuje podíl žen, které otěhotněly, ze všech žen, u nichž byl zahájen cyklus, byly odebrány oocyty a byl proveden transfer.

Pregnancy rate sice vyjadřuje efekt cyklu z pohledu základního cíle neplodného páru- otěhotnění- ale umožňuje srovnání pracovišť nebo metod jen tehdy, byl-li sledovaným ženám stejné věkové skupiny transferován stejný počet embryí. Vzhledem k tomu, že reálně tomu tak téměř nikdy není, lze PR jen obtížně pro srovnání pracovišť nebo metod léčby použít (Trávník a Čech, 2011).

Kumulativní úspěšnost vyjadřuje pravděpodobnost otěhotnění za několik léčebných cyklů. Je-li pravděpodobnost úspěšnosti jednotlivé inseminace 15 %, je kumulativní úspěšnost (tedy počet těhotných žen z výchozí skupiny 100 žen) po šesti cyklech 62%. Proto i relativně málo efektivní metody mají své místo v asistované reprodukci, jsou-li málo rizikové, nenáročné, levné a máme-li k jejich provádění vzhledem k věku ženy dostatek času.

Kumulativní úspěšnost lze vztahovat na nejnáročnější proces v rámci IVF, tedy na stimulaci a odběr oocytů. Jestliže v primárním cyklu IVF ET otěhotní 50% žen a v následném cyklu s transferem kryoembryí je naděje na otěhotnění 30 %, je kumulovaná pravděpodobnost pro skupinu žen, které měly stimulaci, odběr a ty z nich, které neotěhotněly, mají embrya pro 1 kryoembryotransfer, přibližně 65 %.

Někdy se počítá kumulovaná efektivita na tři pojišťovnou hrazené cykly IVF. Ta běžně u pacientek s dobrou prognózou dosahuje 85-90 %. Znovu je nutné připomenout, že všechny tyto údaje se týkají žen do 35 let věku. Ženy starší mají pravděpodobnost přibližně poloviční či třetinovou, mnohé však téměř nulovou. Protože pracoviště nemůže jejich zastoupení ovlivnit, nelze hodnotit kvalitu pracoviště podle celkových výsledků, vždy lze srovnávat jen standardní skupinu žen do věku 35 let (Řežábek, 2014).

4 Materiál a metodika

4.1 Zdroj dat pro analýzu

Sledovaným pracovištěm bylo centrum asistované reprodukce GEST IVF s.r.o.

Sběr dat probíhal v průběhu celého roku 2015. Byly vyhodnoceny výsledky u všech pacientek, které podstoupily stimulaci, odběr vajíček a následný přenos embryí ve sledovaném období. Do analýzy nebyly zahrnuty zákroky, při kterých byla přenášena rozmražená embrya. . Vždy se jednalo o oocyty vlastní, tzn. že vyřazeny byly také všechny pacientky, které k nám přicházejí na tzv. darovací programy, kdy je synchronně stimulovaná dárkyně, vzniklá embrya jsou následně zavedeny ženě- příjemkyni.

Za celý rok 2015 proběhlo na sledovaném pracovišti 277 stimulovaných cyklů. V 52 případech však nedošlo k přenosu embryí a to z různých důvodů. Jednalo se o cykly bez zisku oocytů, nebo oocyty byly získány, ale nedošlo k oplození. V některých případech došlo k projevu tzv. hyperstimulačního syndromu a všechna získaná embrya musela být zamražena, jelikož pacientka nebyla schopna přenosu.

Do studie bylo zahrnuto 225 cyklů (bez ohledu na věk pacientky), které skončily přenosem embryí.

4.2 Odběr oocytů pro IVF a jejich laboratorní hodnocení.

Odběr folikulární tekutiny je prováděn transvaginální punkcí pod kontrolou ultrazvuku, většinou v krátké celkové narkóze. Termín odběru je 35-37 hodin po aplikaci indukční dávky hCG. Vzhledem k provozu laboratoře většinou aplikují pacientky hCG večer ve 20-21 h a odběr folikulární tekutiny se provádí v 8- 10 hodin dopoledne 1, 5 dne poté.

V odebrané folikulární tekutině následně ihned v laboratoři pod mikroskopem jsou vyhledávány oocyty. Oocyty jsou volně uloženy v cumulus oophorus. Nejprve dochází k mechanickému odstranění kumulu pomocí jehel, aby bylo možné lépe posoudit kvalitu oocytu. Tyto oocyty jsou následně uloženy do předem připraveného média v inkubátoru. Nejpozději do 4 hodin, by mělo dojít k oplozování vajíček.

V souboru odebraných oocytů mohou být i oocyty ve fázi tzv. zárodečného váčku, u nichž nedošlo k rozpadu jádra a prvnímu zracímu dělení. Tyto oocyty jsou nezralé a nejsou oplozeníschopné. Oocyty v metafázi I. mají ještě šanci v laboratorních podmínkách dozrát.

Podle počtu získaných zralých oocytů se volí způsob oplození s přihlédnutím k hodnotám spermiogramu, věku pacientky, přání pacientky a v neposlední řadě k jejím finančním možnostem.

4.3 Oplození, kultivace embryí a embryotransfer

Pracovní instrukce a laboratorní postupy jsou sjednoceny pro všechny pracovníky IVF laboratoře a jsou prováděny s ohledem na plnění požadavků normy ČSN EN ISO 9001/2009
Metodiky přípravy spermií k oplozování jsou vybírány dle vstupního spermiogramu. Je-li normální ,nebo jen mírně patologický, volíme centrifugaci přes gradient. Při těžké patologii volíme metodu swim-up.

Příprava spermií k oplozování metodou swim-up: 2 ml zkapalněného ejakulátu je promícháno v centrifugační zkumavce se 3 ml kultivačního média. Centrifugace 10 min při 1750 ot. / min.

Příprava spermií pomocí centrifugace přes gradient: zkumavka s komerčně připraveným a naředěným gradientem je převrstvena 2 ml zkapalněného ejakulátu. Centrifugujeme 20 min/ 1750 otáčkách. Po té je odstraněn sediment a provede se resuspendace s 2 ml média. Opakovaná centrifugace, 10 min./1750 otáčkách. Pasteurovou pipetou dojde k odstranění supernatantu. Sediment je převrstven 0,5 ml kultivačního média. Kultivace 30 min a více v inkubátoru s CO2, při 37 C.

Příprava k oplozování: den předem 5 ml kultivačního roztoku a více, dle počtu punkcí se nechá ekvilibrovat v inkubátoru s CO2.

Folikulární tekutina získaná punkcí je vylita ze zkumavky do Petriho misky a následná identifikace kumulooocytárních komplexů. Nalezené oocyty jsou separovány do kapky kultivačního média, kde následně pomocí jehel dojde k odstranění 50 -70 % kumulárních buněk. Takto ošetřené oocyty jsou následně promyty v 5- 7 kapkách kultivačního média a uloženy do kultivační misky.

Jedná- li se o spontánní oplození, je po cca 2- 4 hodinách přidáno malé množství (cca100 000 mil/ml) předem připravených partnerských spermií.

Před způsobem oplození ICSI nebo PICSI je potřeba oocyty tzv. svléknout pomocí denudačních pipet a enzymu hyaluronidáza. Následně dochází k injekaci spermií pomocí skleněných kapilár dovnitř oocytu pod mikroskopem, za pomocí mikromanipulátorů.

Při obvyklých postupech ICSI jsou spermie pro injekci selektovány vizuálně jen na základě jejich morfologie a hybnosti. Tento způsob ale neodráží integritu genomu spermie a

její schopnost přispět tak co nejlépe ke tvorbě zygoty. Metoda PICSI poskytuje možnost selekce zralých spermií na základě jejich schopnosti vázat se k hyaluronanovému hydrogelu, obsaženému na dně misky. PICSI tedy imituje přirozenou vazbu zralé spermie ke cumulus oophorus, důležitému selektivnímu kroku při přirozeném oplození.

Po oplození jsou embrya kultivována v inkubátorech při 37°C a 6% CO2, při vysoké relativní vlhkosti do následujícího dne. K první kontrole oplození dochází cca po 20 hodinách kultivace, kde by již u oplozených oocytů měla být zřetelná 2 prvojádra. Následně je hodnocena symetrie, pravidelnost a rychlost dělení u oplozených oocytů a stupeň fragmentace. Po 48 hodinách je sdělována pacientce informace o počtu oplozených a vyvíjejících se embryí. 72 hodin, neboli den 3, je prvním možným dnem transferu ve většině případů. Je- li dostatečně velký soubor vyvíjejících se embryí a pacientka nemá jiné přání, kultivace je prodlužována až do 120h, neboli den 5. Za uplynutí této doby, lze již jednoznačně určit embrya vhodná k transferu a k eventuální kryokonzervaci. Embrya vhodná k přenosu volí embryolog.

Samotný přenos probíhá již bez celkové anestezie. Embrya jsou nasáta tenkým pružným přenosovým katetrem a lékař je následně za pomocí ultrazvuku zavádí do dělohy pacientky. Zákrok je krátký, nebolestivý a pacientka může následně odejít domů.

Za stálého užívání léků obsahujících progesteron, podporujících růst děložní sliznice, pacientka přichází po 14 dnech od provedení přenosu na kontrolní gravitest, kde je testována přítomnost hCG.

4.4 Sledování vývoje embryí

Ke sledování vývoje embryí v počátečních stádiích slouží systém Primo Vision. Jedná se o kamery nainstalované v inkubátorech, které snímají embrya v určitých předem nastavených intervalech.

Ostatní sledovaná embrya, u kterých si pacientky nepřály užití semikuntinuálního monitoringu, byla umístěna v kultivačních miskách volně do prostoru inkubátoru. Kontrola vývoje embryí u těchto pacientek probíhaly denně a to vždy ráno v cca 8 hodin . Do analýzy kde byla sledována výhradně morfologie přenášených embryí však nebyly zahrnuty.

Skórovací systém pro hodnocení morfologické kvality embryí:

1. maximálně 10 % fragmentace, pravidelná velikost blastomer, počet blastomer odpovídající délce kultivace, těchto embryí byl nadbytek, tudíž došlo i ke kryokonzervaci nadbytečných.

2. maximálně 20 % fragmentace, pravidelná velikost blastomer, počet blastomer odpovídá délce kultivace, došlo i ke kryokonzervaci nadbytečných embryí.

3. maximálně 20 % fragmentace, pravidelná velikost blastomer, počet blastomer odpovídá délce kultivace, ale nedošlo již ke kryokonzervaci. Nebyla vhodná embrya.

4. maximálně 20 % fragmentace, nepravidelná velikost blastomer, počet blastomer ale odpovídá délce kultivace. Bez kryokonzervace

5. maximálně 30 % fragmentace, nepravidelná velikost blastomer, počet blastomer neodpovídá délce kultivace. Bez kryokonzervace.

6. maximálně 40 % fragmentace, menší počet nepravidelných blastomer neodpovídající délce kultivace. Bez kryokonzervace.

K ohodnocení morfologické kvality embrya a výběru nejvhodnějšího embrya k přenosu je využíván videozáznam zachycující celý průběh kultivace. O výběru embrya rozhoduje embryolog.

14 dní po přenosu embrya, přišla pacientka na kontrolní gravitest, kterým byla prokazována přítomnost hCG v moči. Pokud je test pozitivní, je tento stav označen za biochemickou graviditu. Za klinickou graviditu je považován den, kdy pomocí ultrazvukového vyšetření je zjištěna srdeční akce plodu.

V práci byly použity pouze informace o vzniku biochemické gravidity a k té je vztažena úspěšnost léčby.

4.5 Statistická analýza dat

Pro statistické hodnocení byl v programu statistica použit χ^2 test, který měl určit, zda je gravidita závislá na jednotlivých parametrech podle níže uvedených tabulek. Vypočtené testovací kritérium v závislosti na příslušném počtu stupňů volnosti bylo porovnáno s tabulkovou hodnotou (viz. příloha 1) a následně byla přijata či zamítnuta nulová hypotéza, která předpokládá, že gravidita není závislá na zvolené metodě. Při zamítnutí nulové hypotézy byla vypočítána síla závislosti. Hladina významnosti α byla stanovena 0,05.

Byl ověřován efekt následujících faktorů: závislost věku pacientky na úspěšnosti přenosu, závislost morfologické kvality embrya na úspěšnosti přenosu a závislost počtu odebraných oocytů na úspěšnosti přenosu embrya pacientce.

Předpokládáme alternativní hypotézu, že je závislost na věku a úspěšnosti uhnízdění vajíčka, což nám potvrdil i výpočet χ^2, jehož hodnota 9,0596 převyšuje tabulkovou hodnotu 3,84, proto zamítáme nulovou hypotézu, jež praví, že není závislost gravidity na věku, byla

tedy vypočítána síla závislosti, hodnota 0,2 pak dokazuje slabou až středně silnou závislost na věku pacientky a tedy dokazuje, že se zvyšujícím věkem klesá úspěšnost otěhotnění.

V programu statistica byl vypočítán χ^2 pro morfologickou kvalitu embryí, který vyšel 26,33, zamítáme tedy nulovou hypotézu, že by kvalita embryí neovlivňovala otěhotnění žen. Síla závislosti je 0,5183, tedy kvalita embryí středně silně až silně ovlivňuje úspěšnost gravidity.

Počet do 10 a nad 10 přenesených zralých oocytů nebyla prokázána statisticky významná závislost. Jak u žen do 35 let tak u žen nad 35let vyšla hodnota χ^2 nižší (0,0425 u žen do 35 let a 0,0806 u žen nad 35let) než hodnota tabulková, proto byla přijata nulová hypotéza a počet přenesených oocytů nemá významný vliv na úspěšnost gravidity u žen.

Statisticky významná závislost metody PCSI či ICSI na úspěšnost gravidity nebyla prokázána ani u žen do 35 let, za výpočtu stejné statistické metody, kdy χ^2 vyšel 2,316 a byl tedy nižší než tabulková hodnota za hladiny významnosti 0,05.

Po výpočtu χ^2 u žen do 35 let nebyla prokázána statisticky významná závislost gravidity na stáří použitých embryí (χ^2 = 1,36), u žen nad 35 let již hodnota χ^2 5,26 přesahuje tabulkovou hodnotu a je tedy závislost statisticky průkazná, síla závislosti je ovšem poměrně malá (V=0,215).

5 Výsledky, analýza dat

Z celkem 225 cyklů (bez ohledu na věk pacientky),které skončily přenosem embryí, mělo pozitivní gravitest 71 pacientek, 152 pacientek mělo gravitest negativní a u dvou pacientek nebyl znám výsledek testu. Efekt všech sledovaných faktorů je dokumentován jednotlivě, tedy pro každý sledovaný faktor samostatně. Z 97 žen do 35 let mělo pozitivní gravitest 41, na rozdíl od žen nad 35 let, kterých bylo 128, otěhotnělo však pouze 30. Tento rozdíl v úspěšnosti léčby žen starších a mladších 35 let je vysoce statisticky průkazný. Celkovou úspěšnost přenosu u žen do 35 a nad 35 let udává tabulka č. 2

Tabulka č. 2: Úspěšnost přenosu embryí vyjádřena podílem dosažených gravidit z počtu provedených přenosů (1 cyklus= 1 přenos) v závislosti na věku.

Pacientek	Počet cyklů	Počet gravidit	Úspěšnost (%)
Celkem	225	71	**31, 8**
Do 35 let včetně	97	41	**42, 3***
Nad 35 let	128	30	**23, 6***

* hodnoty se výrazně statisticky liší

Ne vždy byla přenášena embrya ve stádiu blastocysty, tedy 5 ti denní. Výjimečně také přenášíme embrya 2 a 4 denní. Jako nejvýhodnější je osvědčený den 3 nebo 5. V některých případech jsou přenášena embrya dle výslovného přání pacientky viz tabulka č. 3. Přenosy embryí ve stáří 48 nebo 96 hodin byly spíše ojedinělé a z tohoto důvodu nelze jejich úspěšnost statisticky hodnotit. Výrazně nižší byla ovšem úspěšnost přenosu embryí ve skupině starších žen, po přenosu 5 ti denních embryí.

Tabulka č. 3: Úspěšnost přenosu embryí v závislosti na délce kultivace

Délka kultivace	Počet pacientek Do 35 let/nad 35 let	Počet gravidit	Úspěšnost (%)
48 hodin.	1/8	0/1	**0/12**
72 hodin	38/60	14/20	**37/33***
96 hodin	3/6	0/1	**0/16**
120 hodin	55/54	27/8	**49/14,8***

*u žen do 35 let není statisticky významný rozdíl, u žen nad 35 let je statisticky významný rozdíl

Ve většině případů bylo přeneseno embryo jedno maximálně dvě. K přenosu tří embryí dnes dochází už jen výjimečně a vždy na přání pacientky. Při zvyšujícím se počtu přenesených embryí vzrůstala i úspěšnost gravidity, jak znázorňuje tabulka č.4

Vzhledem k malému poštu tříčetných přenosů jsou však výsledky statisticky neprůkazné.

Tabulka č. 4: Úspěšnost dle počtu přenesených embryí

Počet přenesených embryí	Počet pacientek Do 35 let/nad 35 let	Počet gravidit	Úspěšnost (%)
1	57/64	21/14	**37/22**
2	37/57	17/14	**46/24, 5**
3	3/7	3/2	**100/28, 5**

Ke kultivaci embryí byly použity čtyři druhy komerčně vyráběných médií. Jednokroková média označená čísly 1 a 2 a sekvenční média 3 a 4. Volba použitého média byla velice individuální s přihlédnutím k historii léčby jednotlivých pacientek. U žen do 35 let bylo dosaženo nejvyšší úspěšnosti za použití média číslo 1, u žen nad 35 let lze za nejúspěšnější označit médiu číslo 2. Souhrnné výsledky v tabulce č. 5 a tabulce č. 6 však ukazují, že výsledky jsou vzájemně srovnatelné, pouze u pacientek nad 35 let byla jednokroková média mírně úspěšnější, ovšem statisticky neprůkazné.

Tabulka č. 5: Úspěšnost přenosu v závislosti na užití jednokrokového kultivačního média

Použité médium	Počet pacientek Do 35let/nad 35let	Počet gravidit	Úspěšnost (%)
1	23/44	13/11	**56, 5/25**
2	28/35	10/10	**36/28, 6**

Tabulka č. 6: Úspěšnost přenosu v závislosti na užití sekvenčního kultivačního média

Použité médium	Počet pacientek Do 35let/nad 35let	Počet gravidit	Úspěšnost (%)
3	13/14	4/3	**31/21, 4**
4	33/35	12/6	**36/17**

Pro oplozování bylo nejčastěji použito metody ICSI a PICSI. Dle tabulky č. 7, by se dala hodnotit metoda ICSI jako úspěšnější, ovšem rozdíl nebyl statisticky významný.

Metoda IVF nemá prokazatelné výsledky z důvodu malého počtu případů v této studii.

Tabulka č. 7: Úspěšnost přenosu, dle způsobu oplození

Metoda oplození	Počet pacientek Do 35 let/ nad 35 let	Počet gravidit	Úspěšnost (%)
PICSI	51/63	18/14	**35 */22**
ICSI	39/64	20/16	**51 */22, 5**
IVF	7/4	3/0	**42/ 0**

*Není statisticky významná závislost

Tabulka č. 8 informuje o počtu pacientek, které využily monitorovacího systému embryí a asistovaného hatchingu. Nejčastěji pacientky požadovaly obojí. Výsledky však byly ve skupinách pacientek do a nad 35 let statisticky nevýznamné.

Tabulka č. 8: Úspěšnost přenosu dle morfologie embryí systémem Primo Vision a užití asistovaného hatchingu

	Počet pacientek do 35 let/ nad 35 let	**Počet gravidit**	**Úspěšnost (%)**
monitoring	37/61	14/17	**38/28**
Asistovaný hatching	39/74	18/17	**46/23**
Monitoring + asistovaný hatching	30/60	10/17	**33/28**

Zhodnocení morfologické kvality embryí uvádí tabulka č. 9. Nejlepší výsledky byly dosaženy při transferu embryí ohodnocených 1 a 2, lze tedy potvrdit, že snižující se kvalitou embrya klasá úspěšnost jeho implantace v děloze.

Tabulka č. 9: Úspěšnost přenosu embryí dle jejich morfologického hodnocení

Kvalita	**Počet pacientek celkem**	**Počet gravidit**	**Úspěšnost (%)**
1	11	4	**36**
2	25	15	**60**
3	7	2	**28, 6**
4	22	2	**9**
5	23	2	**8, 7**
6	10	0	**0**

Rozdíly v úspěšnosti po přenosu embrya u pacientek, které měly při punkci zisk oocytů menší či větší než 10, nebyly statisticky prokázány, jak uvádí tabulka č. 10. Rozdíly byly opět patrné pouze po rozdělení pacientek dle věkových skupin.

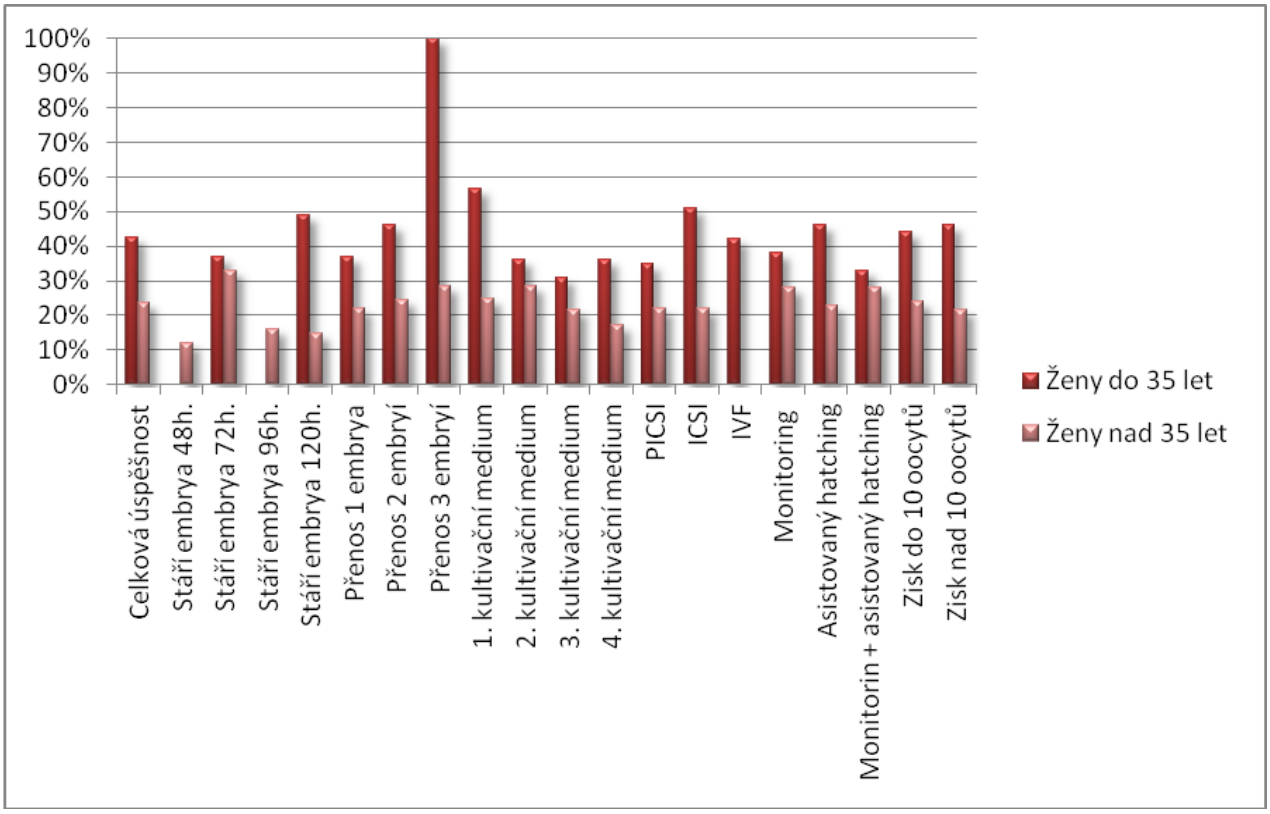
Tabulka č. 10: Úspěšnost přenosu v závislosti na počtu odebraných oocytů.

Počet oocytů	**Počet pacientek Do 35 let/nad 35 let**	**Počet gravidit**	**Úspěšnost (%)**
Do 10 ti oocytů	62/100	27/24	**44/24**
Nad 10 oocytů	35/28	16/6	**46/21, 4**

Po shrnutí všech výsledků lze dojít k závěru, že ženy do 35 let dosahovaly gravidity při použití jednotlivých metod v rozmezí od 0% do 100%. Viz graf č. 1. To výrazně ovlivnilo další výsledky a bylo to způsobeno tím, že v některých sledováních bylo velmi málo případů. S 95% pravděpodobností se hodnoty pohybovaly v rozmezí od 30,27% do 50,09%, prostřední hodnota je 38% a nejčastěji byla úspěšnost 46%, Variační koeficient 51,17% vypovídá o skutečnosti, že z vypozorovaných výsledků byla vyšší variabilita v úspěšnosti gravidity u žen do 35let než u žen nad 35let.

U žen nad 35let nepřesáhla úspěšnost gravidity 33%, v průměru otěhotnělo 21,64% žen. S 95% spolehlivostí se úspěšnost gravidity u starších žen pohybovala v rozmezí od 18,06% do 25,22%, po vzestupném seřazení byla prostřední hodnotou úspěšnost 22%, to byl také nejčastěji se vyskytující výsledek. Proměnlivost u starších žen byla nižší, než u žen do 35let včetně, ovšem u mladších žen byly výsledky ovlivněny extrémními hodnotami, které byly zároveň takto extrémní z důvodu malého počtu případů.

Graf č. 1: Úspěšnost přenosu dle jednotlivých sledovaných variant metodiky.



6 Diskuze

Věk pacientky na další úspěšnost léčby pomocí metod IVF byl jednoznačně prokázán a to ve všech jednotlivých sledovaných parametrech, což je patrné z tab. Č. 2 až 9. Hraničním věkem pacientek bylo zvoleno 35 let, protože jak uvádí Řežábek (2014), pravděpodobnost otěhotnění po 35 roce věku začíná klesat a s postupujícím věkem se prognóza neplodnosti zhoršuje. Ve věku 40 let a více se blíží nule. Na druhou stranu se současným životním stylem je potřeba počítat s tím, že skupina starších žen, které budou chtít podstoupit léčbu IVF se bude neustále zvětšovat a tomu je potřeba přizpůsobit metody léčby. Vhodnou alternativou je dnes již běžně v praxi používaný darovací program. Tzn. oplození oocytu pocházejícího od mladší dárkyně a jeho následné vložení do ženy příjemkyně.

Marek et al. (1999) uvádějí zvýšení úspěšnosti implantace embrya při zavádění blastocyst ve srovnání s časnějšími stádii vývoje embryí a to ve všech věkových kategoriích, včetně žen nad 39 let. Problém rostoucího věku ženy s sebou nese spíše riziko nižší reakce na ovariální stimulaci, nemá však vliv na kvalitu vzniklých blastocyst (Mardešič et al., 2013).

Signifikantně nižší úspěšnost implantace embrya a následné otěhotnění jsou zapříčiněny chromozomálními abnormitami, které nejsou slučitelné se vznikem blastocysty a jsou v rozporu s dalším embryonálním vývojem (Gardner et al., 2004).

Při určování délky kultivace a dne přenosu bylo přihlíženo nikoliv k věku pacientky, ale primárně k morfologické kvalitě embryí a to především třetí den ráno. Toto však nebyl jediný parametr volby dne přenosu. Vždy jsme volili velice individuálně, s přihlédnutím k historii léčby pacientky. Pokud došlo v minulých cyklech k těhotenství při přenosu v určitý den, volili jsme primárně den stejný. Pokud k těhotenství nedošlo, snažili jsme se plánovat den přenosu v odlišný den. Pokud měla pacientka pouze jedno, nebo dvě vyvíjející se embrya, pak přestože se tato embrya nevyvíjela optimálně, kultivaci jsme neprodlužovali a provedli jsme transfer druhý, nebo třetí den. V některých případech pacientky otěhotněly. Pokud bychom embrya nechali v laboratorních podmínkách až do pátého dne, s velkou pravděpodobností by k přenosu vůbec nedošlo, protože by mohlo dojít k úplné zástavě jejich vývoje. Z tohoto důvodu jsme tuto strategii volili, přestože celková úspěšnost na přenos tím pravděpodobně mohla klesnout. Naše data nepotvrdila větší úspěšnost přenosu u pacientek do 35 let věku po přenosu blastocyst a výsledky jsou srovnatelné s přenosy pouze třídenních embryí. Tento rozdíl se výrazněji potvrdil u věkové skupiny pacientek nad 35 let.

Hlavním hlediskem při selekci embryí pro zavedení do dělohy pro nás však stále zůstává jejich morfologie. I když se v literatuře objevují různé snahy o skórování kvality blastocyst (Gardner et al., 2004) a jsou známa určitá obecná kritéria, chybí jednotný přijímaný systém klasifikace jejich morfologie. Ve studii byl popsán systém hodnocení embryí od vzniku prvojader až do stádia blastocysty a to dle stupně fragmentace, pravidelnosti dělení jednotlivých blastomer a dodržení optimálního času dělení. Blastocysty byly klasifikovány na základě velikosti vytvořeného blastocoelu, embryoblastu a trofoblastu. Jurisicova et al. (1996) po studiu fragmentovaných a nefragmentovaných embryí usoudili, že vzhledem k vyššímu obsahu kondenzovaného chromatinu, degradované DNA, mrtvých buněk, apoptických tělísek, které se běžněji nacházejí ve fragmentovaných embryích, fragmentace skoro jistě indikuje snížený potenciál dalšího růstu.

U embryí starých 48 a 96 hodin je výrazně, prokazatelně nižší úspěšnost gravidity, ovšem pro absolutní závěry by bylo zapotřebí více nasbíraných dat, která nejsou k dispozici zvláště z důvodu výrazně častějšího využití tradičního již osvědčeného postupu.

Analýza uplynulého roku také vyvrací tvrzení o všeobecně uznávané metodě prodloužené kultivace embryí až do stádia blastocysty jako nejlepší volbu. Výsledky byly srovnatelné a dokonce ve skupině žen nad 35 let se jako výhodnější jeví kultivace pouze do třetího dne a následný transfer.

Sakkas (1999) a Virant-Klun et al. (2003) navrhují provádět kultivaci do stádia blastocysty kvůli vyhnutí se negativním paternálním účinkům na vývoj embrya po ICSI.

Bude-li ale hodnocena úspěšnost přenosu dle vývoje embrya v prvních fázích dělení pomocí zařízení Primo Vision, lze jednoznačně potvrdit, že morfologická kvalita přenášených embryí má zřejmý vliv na jejich implantační potenciál. Úměrně se snižující se morfologickou kvalitou přenášených embryí se snižuje i úspěšnost celého léčebného cyklu.

Milki et al (1999) uvádí že s fragmentací a s pomalým vývojem embryí jsou častěji spojovány jak numerické, tak strukturální chromozomální abnormality. Více než 50 % těchto embryí má abnormální genetickou výbavu, což může být důvodem jejich sníženého implantačního potenciálu.

Ve snaze redukovat vícečetná těhotenství a rizika s tím spojená se postupně snižuje počet embryí k přenosu. Tento trend je spjat s potřebou vybrat embrya co nejkvalitnější, s předpokládanou dobrou životaschopností.

Vlivem tohoto trendu bylo celkově v uplynulém roce největší počet pacientek, u kterých proběhl přenos pouze jednoho embrya. Bohužel, některé pacientky neměly více než jedno kvalitní embryo u jiných pacientek embrya neměla požadovanou kvalitu, nebo pacientka již

absolvovala několik neúspěšných cyklů a v tom případě byla zaváděna embrya 2 nebo 3. U pacientek do 35 let byl zaznamenán větší podíl transferů jen jednoho embrya, zatímco u pacientek nad 35 let stoupá zájem o transfer dvou a více embryí. Největší úspěšnost byla zaznamenána u ojedinělých případů transferů tří embryí. Ovšem výsledek tohoto rozhodnutí, zdali došlo k nežádoucí vícečetné graviditě tato analýza neumožňuje. Lze říci že nejvyšší úspěšnost přenosu je zaznamenána u dvou zavedených embryích. Celková úspěšnost byla u pacientek mladších jednoznačně vyšší a rozdíl mezi transferem jednoho či dvou embryí byl také znatelnější než u pacientek starších, kde byly rozdíly velmi nevýrazné.

Asistovaný hatching je další z mikromanipulačních technik, jejíž pozitivní vliv na další vývoj embrya byl sledován. Žáková (2014) uvádí, že zvyšuje implantační potenciál embrya nejen mechanicky usnadněním procesu hatchingu, ale také tím, že dojde ke zprostředkování časnějšího kontaktu embrya s endometriem. Pozitivní vliv narušení zona pellucida pro úspěšnost implantace potvrdili Malter a Cohen (1989), kteří pozorovali, že embrya s artificiální štěrbinou zahajují hatching dříve, to vedlo k myšlence provádět otvor v zona pellucida u embryí před transferem.

Na sledovaném pracovišti byl asistovaný hatching prováděn mechanicky, pomocí mikromanipulačních jehel. Nelze však jednoznačně potvrdit, že by tato metoda zvyšovala šance embrya na jeho implantaci v děloze. Určité zvýšení je opět patrné u pacientek do 35 let věku. Vzhledem k tomu, že většina pacientek, které volí asistovaný hatching, volí současně i kontinuální monitoring embryí, nemůžeme jednoznačně říci, zdali lepší výsledky u pacientek do 35 let jdou na vrub výběru morfologicky nejlepšího embrya, nebo asistovaného hatchingu.

Zisk oocytů a jejich kvalita po ovariální punkci je dalším z důležitých faktorů ovlivňujících úspěšnost léčby. Je-li zisk oocytů příliš nízký, může nastat situace, kdy se musí přenášet všechna vyvíjející se embrya bez možnosti provedení selekce dle jejich morfologické kvality. Je-li naopak zisk oocytů příliš vysoký, hrozí nebezpečí vzniku hyperstimulačního syndromu a ne všechny oocyty bývají ve stejné kvalitě a stupni zralosti.

Naše data ovšem neprokázala souvislost mezi počtem a kvalitou získaných oocytů. Rozdíly byly zaznamenány pouze u pacientek do 35 let včetně a nad 35 let. Nelze jednoznačně prokázat přímou souvislost mezi kvalitou oocytu a dalším vývojem embrya, protože k oplozování byla určena pouze vajíčka zralá a jejich kvalita byla hodnocena subjektivně.

Nebyla také prokázána vyšší úspěšnost léčby při použití metody ICSI nebo PICSI. Dokonce u pacientek do 35 let byla zaznamenána větší úspěšnost po užití pouze ICSI metody.

Metoda IVF (spontánní oplození ve zkumavce) jsme použili minimálně, výsledky tedy nejsou srovnatelné.

Nebyla prokázána souvislost mezi použitím různých kultivačních médií a úspěšností a lze tedy potvrdit hypotézu, že kvalita embryonálního vývoje se významně neliší.

Naopak nižší věk pacientky se pozitivně projevil ve všech sledovaných parametrech a to velice výrazně.

6. Závěr

Asistovaná reprodukce je v dnešní době již běžnou součástí reprodukční medicíny. Každý rok se díky ní narodí tisíce dětí po celém světě. Zavedení a rozvoj metod asistované reprodukce lze tedy právem považovat za jeden z historických milníků medicíny 20. století.

Moderní technologické postupy, při kterých se v rámci neplodnosti manipuluje s lidskými buňkami, se provádí na specializovaných pracovištích, tzv. centrech asistované reprodukce.

Jedním z nejdůležitějších kritérií úspěšnosti léčby, je kvalita embryí zaváděných do dělohy.

V diplomové práci byly hodnoceny některé metody a postupy běžně prováděné v embryologické laboratoři na souboru pacientek, které podstoupily léčbu metodou IVF v průběhu roku 2015 a bylo zjištěno že:

1.existuje přímá souvislost mezi věkem pacientek a úspěšností přenosu a to celkově, i jednotlivě při vyhodnocení sledovaných parametrů zvlášť.

2.nebyly zaznamenány výrazné rozdíly mezi embryi zaváděnými třetí nebo pátý den, dokonce u skupiny pacientek nad 35 let, se jako výhodnější den přenosu projevil den tři.

3.kromě statisticky nevýznamného přenosu třech embryí, vzhledem k malému počtu případů, byl rozdíl mezi přenosem jednoho nebo dvěma embryi statisticky nevýznamný.

4.nebylo prokázáno, že by kvalita embrya , jeho následné hodnocení a úspěšnost přenosu byla ovlivněna druhem použitého kultivačního média.

5. nebyl statisticky prokázán rozdíl mezi úspěšností přenosu a způsobem oplození, vyjma oplození spontánního, které se používalo zcela výjimečně.

6. úspěšnost léčby je vyšší při přenosu embryí se správným morfologickým vývojem v raných fázích dělení.

7.. nebyl potvrzen pozitivní vliv na implantační schopnost embrya po provedení asistovaného hatchingu ani v kombinaci s použitím kontinuálního monitoringu.

8. počet odebraných oocytů po hormonální stimulaci pacientky se v úspěšnosti přenosu nijak neprojevil.

U všech sledovaných parametrů, byla prokázána souvislost úspěšnosti přenosu na věku pacientky. Věk pacientky se tedy jeví jako primární při volbě správné metody oplození a zároveň počtu přenášených embryí.

Jen kolektivní práce gynekologa, který zvolí vhodný druh stimulace vaječníků pacientky pro optimální zisk kvalitních zralých oocytů a embryologa volícího správné technologické laboratorní postupy může vést k dobrým výsledům léčby.

7 Použitá literatura

- Blaban, B., Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Cowan, L., Ebner, T., Gardner, D., Hardarson, T., Lundun, K., Magli, C. M., Mortimer, D., Mortimer, S., Munné, S., Royer, D., Scott, L., Smitz, J., Thornhill, A., van Blerkom, J., Van den Abbeel, E. 2011. The Istanbul Consensus Workshop on Embryo Assessment: Proceedings of an Expert Meeting. HUMAN REPRODUCTION. 26(6). 270-1283.

- Bongso, A. 1999, Blastocyst Culture, Department of Obsterics and Gynekology. Nstinal university hspital Loir kent ridge road. Singapore. s. 93. ISBN: 981-4-1283-5

- Chan, S., Anderson, P., Christiansen, C., Londerholm, S., Tobias, T., O´Kane, C., Hummel, W., Kettel, M. 2000. Blastocyst Culture: Analysis of Factors Affecting the Development of Embryos to the Blastocyst Stage. FERTILITY AND SERTILITY. 73(4). DOI: 10.1016/S0015-0282(00)00436-2.

- Čekal, M., Šulc, J. 1997. Průvodce ženy jiným stavem. Ivo Železný. Praha. s. 127. ISBN: 80-237-3509-8.

- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., Schoolcraft, W. B. 2015. Oocyte environment: Follicular Fluid and Cumulus Cells are Critical for 41oocyte Health. FERTILITY AND STERILITY. 103(2). 303-316.

- Fanchin T. 1998. Uterine Contractions at the Time of Embryo Transfer after Pregnancy Razes after in vitro- vitro Fertilization. HUMAN REPRODUCTION. 13(7). 1968-1974.

- Ferin, M., Jewelewicz, R., Waren, M. Menstruační cyklus. 1997. Grada Publishing. Praha. s. 288. ISBN: 80-7169-350-2.

- Gardner, D. K., Weissman, A., Howles, C. M., Shohan, Z. 2004. Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives. Taylor and Francis Group. London. s. 984. ISBN: 1-84184-313-x.

- Jurisicova, A., Varmuza, S., Casper, R. F. 1996. Programed Cell Death and Human Embryo Fragmentation. MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION. 2(2). 93-98.

- Kubíček, V. 1996. Mužská neplodnost. StudiaGeo. Praha. s. 78. ISSN: 1211-0795.

- Lessey, B. A. 2000. The Role of the Endometrium During Embryo Implantation. HUMAN REPRODUCTION. 15(6). 39-50.

- Letterie, G. S., Marshall, L., Angle, M. 2000. Does Blastocyst Transfer Really Impact Clinical Outcome? FERTILITY AND SERTILITY. 73(4). DOI: 10.1016/S0015-0282(00)00448-9.

- Malter, H., Cohen, J. 1989. Blastocyst Formation and Hatching in vitro Following Zona Dribbling of Mouse and Human Embryo. GAMETE RESEARCH. 24(1). 67-80.

- Mardešič, T., Chládek, D., Kosařová, M., Lonský, P. 2013. Diagnostika a léčba poruch plodnosti. Grada Publishing. s. 96. ISBN: 978-80-247-4458-2.

- Marek, D., Langley, M., Gardner, D. K., Confer, N., Doody, K. M., Doody, K. J. 1999. Introduction of Blastocyst Culture and Transfer for allP in an in vitro Fertilization Program. FERTILITY AND STERILITY. 72(6). 1035-1040.

- Milki, A. A., Fisch, J. D., Behr, B. 1999. Two Blastocyst Transfer Has Similar Pregnancy Rates and Decreased Multiple Gestation Rate Compared to Three Blastocyst Transfer. FERTILITY AND SERTILITY. 72(2). 225-228.

- Patrizio, P., Tucker, M. J., Guelman, V. 2003. A Color Atlas for Human Assisted Reproduction: Laboratory and Clinical Insights. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. ISBN: 0-7817-3768-9.

- Plachot, M., Belaich-Allart, J., Mayenga, J. M., Chouraqui, A., Serkine, A. M., Tesquier, L. 2000. Blastocyst Stage Transfer: The Real Benefits Compared with Early Embryo Transfer. HUMAN REPRODUCTION. 15(6). 24-30.

- Petr, J. 2011. Vědci i média živí spor o sperma dánských mužů. [online] 2011. [cit. 17-11-2015]. Dostupné z: http://www. tribune. cz/clanek/24034

- Rodriquez, J. A., Bookout, D., Hardwick, C., Ward, D., Madden, J., Meintjes, M. 2000. Does Blastocysttransfer Attenuate the Expected Age-related Decline in Pregnancy and Implantation Rates? FERTILITY AND STERILITY. 74(3). 97.

- Rutarová, J., Koubková, B., Řezáčová, J., Hlinka, D., Lazarovská, S., Pichlerová, M. Selekce lidských embryí podle délky buněčných cyklů a pravidelnosti dělení. Postgraduální medicína. [online] 2012. [cit. 27-7-2015]. Dostupné z: http://zdravi. e15. cz/clanek/postgradualni-medicina/selekce-lidskychembryi-podle-delky-bunecnych-cyklu- a- pravidelnosti -deleni-463809

- Řežábek, K., 2011. Asistovaná reprodukce 2. aktualizované a doplněné vydání. Maxdorf s. r. o. Praha. s. 137. ISBN: 978-80-7345-396-1.

- Sakkas, D. 1999. The Use Blastocyst Culture to Avoid Inheritance of an Aabnormal Paternal Genome after ICSI. HUMAN REPRODUCTION. 15(12). 2455-2459.

- Tauwinklová, G. Mikromanipulační techniky. [online] 2000. [cit. 23-3-2016]. Dostupné z: http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/mikromanipulacni-techniky-134351

- Trávník, P., Čech, S. 2011. Základy obecné a speciální embryologie pro klinické embryology. YBUX s. r. o. Brno. s. 143. ISBN: 978-80-904697-0-9.

- Ulčová-Gallová, Z. 2006. Neplodnost – útok imunity. Grada Publishing. Praha. s. 144. ISBN: 80-247-1493-0.

- Vacek, Z. 2006. Embryologie. Grada Publishing. Praha. s. 256. ISBN: 80-247-1267-9.

- Virant-Klun, I., Tomazevic, T., Zorn, B., Bacer-Kermavner, L., Mivsek, J., Meden-Vrtovec, H. 2003. Blastocyst Formation-good Indicator of Clinical Results after ICSI with Testicular Spermatozoa. HUMAN REPRODUCTION. 18(5). 1070-1076.

- Zetová, L. 23. března 2016. Osobní sdělení.

- Žáková, J. 2014. Vývoj a podíl embryologie v programu asistované reprodukce. Brno. Habilitační práce, komentovaný soubor prací. s. 235.

- Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Lousová, E., Sochorová, K., Pohanka, M., Huser, M. 2012. Nové metody zvyšující úspěšnost asistované reprodukce. ČESKÁ GYNEKOLOGIE. 77(2). 199-202.

8 Přílohy

Příloha 1: tabulka pro χ^2 test

Kritické hodnoty χ^2- testu pro pravděpodobnost P = 0,95 až 0,001 a pro počet stupňů volnosti *f* = l až 30.

	Pravděpodobnost (hladina významnosti)										
F	**0,95**	**0,90**	**0,80**	**0,70**	**0,50**	**0,30**	**0,10**	**0,05**	**0,02**	**0,01**	**0,001**
1	0,004	0,016	0,064	0,15	0,46	1,07	2,71	3,84	5,41	6,64	10,83
2	0,103	0,21	0,45	0,71	1,39	2,41	4,61	5,99	7,82	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,67	6,25	7,82	9,84	11,34	16,27
4	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,88	7,78	9,49	11,67	13,28	18,47
5	1,15	1,61	2,34	3,00	4,35	6,06	9,24	11,07	13,39	15,09	20,52
6	1,63	2,20	3,07	3,83	5,35	7,23	10,65	12,59	15,03	16,81	22,46
7	2,17	2,83	3,82	4,67	6,35	8,38	12,02	14,07	16,62	18,48	24,32
8	2,73	3,49	4,59	5,53	7,34	9,52	13,36	15,51	18,17	20,09	26,13
9	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,66	14,68	16,92	19,68	21,67	27,88
10	3,94	4,87	6,18	7,27	9,34	11,78	15,99	18,31	21,16	23,21	29,59
11	.4,57	5,58	6,99	8,15	10,34	12,90	17,28	19,68	22,62	24,73	31,26
12	5,23	6,30	7,81	9,03	11,34	14,01	18,55	21,03	24,05	26,22	32,91
13	5,89	7,04	8,63	9,93	12,34	15,12	19,81	22,36	25,47	27,69	34,53
14	6,57	7,79	9,47	10,82	13,34	16,22	21,06	23,69	26,87	29,14	36;12
15	7,26	8,55	10,31	11,72	14,34	17,32	22,31	25,00	28,26	30,58	37,70
16	7,96	9,31	11,15	12,62	15,34	18,42	23,54	26,30	29,63	32,00	39,25
17	8,67	10,09	12,00	13,53	16,34	19,51	24,77	27,59	31,00	33,41	40,79
18	9,39	10,87	12,86	14,44	17,34	20,60	25,99	28,87	32,35	34,81	42,31
19	10,12	11,65	13,72	15,35	18,34	21,69	27,20	30,14	33,69	36,19	43,82
20	10,85	12,44	14,58	16,27	19,34	22,78	28,41	31,41	35,02	37,57	45,32
21	11,59	13,24	15,45	17,18	20,34	23,86	29,62	32,67	36,34	38,93	46,80
22	12,34	14,04	16,31	18,10	21,34	24,94	30,81	33,92	37,66	40,29	48,27
23	13,09	14,85	17,19	19,02	22,34	26,02	32,01	35,17	38,97	41,64	49,75
24	13,85	15,66	18,06	19,94	23,34	27,10	33,20	36,42	40,27	42,98	51,18
25	14,61	16,47	18,94	20,87	24,34	28,17	34,38	37,65	41,57	44,31	52,60
26	15,38	17,29	19,82	21,79	25,34	29,25	35,56	38,89	42,86	45,64	54,05
27	16,15	18,11	20,70	22,72	26,34	30,32	36,74	40,11	44,14	46,96	55,50
28	16,93	18,94	21,59	23,65	27,34	31,39	37,92	41,34	45,42	48,28	56,89
29	17,71	19,77	22,47	24,58	28,34	32,46	39,09	42,56	46,69	49,59	57,45
30	18,49	20,60	23,36	25,51	29,34	33,53	40,26	43,77	47,96	50,89	59,70