

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta



**ÚSPĚŠNOST IVF A ET PO PŘENOSU EMBRYÍ S  
„POMALÝM“ NÁSTUPEM DĚLENÍ  
(NEC – *no early cleavage embryo*)**

**Diplomová práce**

**Bc. Marie Řeřuchová**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie pro víceoborové studium - biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2011**

**Vedoucí práce: RNDr. Jana Březinová, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama a že uvádím veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne 15.8.2011

Bc. Marie Řeřuchová

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé práce RNDr. Janě Březinové, Ph.D. a odborné konzultantce doc. MUDr. Ivaně Oborné, Ph.D. za cenné rady a ochotu pomoci mi během vypracování mé diplomové práce.

Chtěla bych dále poděkovat RNDr. Mileně Krškové z Centra výpočetní techniky UP a Mgr. Lence Radové, Ph.D. z Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FNOL za statistické zpracování souboru a vyhodnocení výsledků.

## Bibliografická identifikace

- Jméno a příjmení autora:** Marie Řeřuchová
- Název práce:** Úspěšnost IVF a ET po přenosu embryí s „pomalým“ nástupem dělení (NEC – no early cleavage embryo)
- Typ práce:** diplomová práce
- Pracoviště:** Centrum asistované reprodukce,  
Gynekologicko–porodnická klinika LF
- Vedoucí práce:** RNDr. Jana Březinová, Ph.D.
- Rok obhajoby práce:** 2011
- Souhrn:** Jednou z mnoha prudce se rozvíjejících disciplín moderní doby jsou metody asistované reprodukce. Snížená plodnost páru je jedním z hlavních problémů dnešní doby. Za normální plodnost se označuje stav, kdy žena přijde do jiného stavu nejpozději do dvou let při pravidelném nechráněném pohlavním styku. Při metodách asistované reprodukce dochází v *in vitro* podmínkách k oplození oocyty spermií a vývoji embrya. Jedním z hlavních úkolů embryologa je vybrat na základě řady hodnotících parametrů nejkvalitnější a nejživotoschopnější embryo, které bude transferováno do dělohy. Základními cíli výběru tzv. *top embrya* je úspěšné zakončení cyklu graviditou. Jedním z mnoha klasifikačních parametrů embrya je doba nástupu prvního buněčného dělení. Dojde-li k nástupu prvního buněčného dělení během 22 – 25 hodin po oplození oocyty, označujeme toto embryo jako tzv. *early cleavage* (EC) embryo. Pokud k nástupu prvního buněčného dělení dojde později, jedná se o embryo s pomalým nástupem dělení tzv. *non early cleavage* (NEC) embryo. K transferu embrya do dělohy dochází 2 – 6 dnů po fertilizaci oocyty. Vedou se četné vědecké diskuze, zda je úspěšnější cyklus s transferem tří denního nebo pětidenního embrya. Ve své diplomové práci se zabývám úspěšností cyklů s přenosem tzv. NEC embryí v souvislosti s délkou kultivace a výsledkem dosaženého těhotenství z dat získaných z Centra asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky LF UP a FNOL.
- Klíčová slova:** neplodnost, asistovaná reprodukce, EC embryo, NEC embryo
- Počet stran:** 91
- Počet příloh:** 0
- Jazyk:** Čeština

## Bibliographical identification

**Autor's first name and surname:** Marie Řeřuchová

**Title:** Outcome of IVF and ET treatment after transfer of no early cleavage embryos (NEC)

**Type of thesis:** magister

**Department:** Centre of asisted reproduction

**Supervisor:** RNDr. Jana Březinová, Ph.D.

**The year of presentation:** 2011

**Summary:** Methods of assisted reproduction are some of the most rapidly developing disciplines of the modern age. Low fertility of a couple is one of the main problems at present. Normal fertility is what we call a situation when a woman gets pregnant within two years provided that there is a regular sexual intercourse. When assisted reproduction is done the fertilization of the oocyte by the sperm happens *in vitro*. The fertilized oocyte, from which embryo develops, is cultivated also *in vitro*. One of the main tasks of an embryologist is to pick the embryo which is most capable of survival to be transferred into the uterus. The embryologist does so on the basis of many criteria. The main goal of the selection of what we call the *top embryo* is to achieve pregnancy. One of the criteria used is the time when the first cell division comes. If it happens within the 22 – 25 hours after fertilization, we call this embryo an *early cleavage* (EC) embryo. If the first cell division happens later it is an embryo with a late division onset - a *non early cleavage* (NEC) embryo. The embryo is transferred into uterus 2 – 6 days after fertilization. There has been a lot of scientific discussion on the question whether the transfer of a 3-day or a 5-day embryo is more succesful. This issue is also the topic of this diploma thesis, as well as evaluating the data achieved in the Centre of Assisted Reproduction of the Gynecologic department of The Medical Faculty and Faculty Hospital in Olomouc.

**Keywords:** sterility, assisted reproduction, EC embryo, NEC embryo

**Number of pages:** 91

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

## Přehled použitých zkratk

<b>AB</b>	<i>ABortis</i> , rané těhotenské ztráty
<b>AH</b>	<i>Assisted Hatching</i> , narušení zóny <i>pellucida</i>
<b>ART</b>	<i>Assisted Reproduction Technologies</i> , techniky umělého oplodnění
<b>ATP</b>	<i>Adenosine TriPhosphate</i> , adenosin trifosfát – zdroj energie pro buňku
<b>bio PR</b>	<i>Pregnancy Rate</i> , vyjadřuje v procentech počet biochemicky potvrzených těhotenství po embryotransferu
<b>BDPN</b>	<i>Break Down ProNuclear</i> , embryo s rozpuštěným jaderným obalem
<b>DNA</b>	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
<b>EC</b>	<i>Early Cleavage</i> embryo (22-25 hodin po inseminaci již proběhlo první buněčné dělení)
<b>eSET</b>	<i>elective Single Embryo Transfer</i> , přenos jednoho vybraného embrya
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> , metoda fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>FSH</b>	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> , folikuly stimulující hormon
<b>FR</b>	<i>Fertilization Rate</i> , udává počet oplozených oocytů v procentech
<b>GIFT</b>	<i>Gamete Intra- Fallopian Transfer</i> , přenos gamet do vejcovodů
<b>GnRH1</b>	hormon gonadoliberin, regulující hladinu gonadotropinů
<b>hCG</b>	<b>H</b> uman <b>C</b> horionic <b>G</b> onadotropin, lidský choriový gonadotropin
<b>HLA-G</b>	lidský leukocytární antigen
<b>HLS1</b>	skupina histonů podílející se na zdárném průběhu oplodnění oocytu spermií
<b>HSK</b>	<b>H</b> ystero <b>S</b> Kopie, endoskopické vyšetření dělohy
<b>ICM</b>	<i>Inner Cell Mass</i> , vnitřní masa buněk
<b>ICSI</b>	<i>IntraCytoplasmic Sperm Injection</i> , vpich jedné spermie do oocytu
<b>IMSI</b>	<i>Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection</i> , výběr nejvhodnější spermie k oplození oocytu dle její morfologie
<b>IR</b>	<i>Implantation Rate</i> , vyjadřuje v procentech počet gestačních váčků s akcí srdeční na počet přenášených (transferovaných) embryí
<b>IVF a ET</b>	<i>In Vitro Fertilization a Embryo Transfer</i> , oplození oocytu mimo tělo ženy a přenos vzniklého embrya do dělohy

<b>LH</b>	<i>Luteinizing Hormone</i> , luteinizační hormon
<b>LSK</b>	Laparo <b>SK</b> opie, endoskopické vyšetření malé pánve
<b>NEC</b>	<i>No Early Cleavage</i> embryo (v době 22 – 25 hodin po inseminaci zůstává ve stádiu prvojader nebo došlo jen k rozpuštění karyolemy)
<b>OS</b>	<b>Oxidační Stres</b>
<b>PCOS</b>	<i>PolyCystic Ovary Syndrome</i> , syndrom polycystických ovárií
<b>PDG</b>	preimplantační diagnostika embrya
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , polymerázová řetězeová reakce
<b>PICSI</b>	<i>Preselected IntraCytoplasmic Sperm Injection</i> , výběr zralé spermie pro oplodnění oocytu
<b>PN</b>	<i>ProNuclear</i> , prvojádro vzniklé bezprostředně po oplození
<b>PR</b>	<i>Pregnancy Rate</i> , vyjadřuje v procentech počet získaných těhotenství na embryotransfer
<b>PRM1</b>	protamin 1, látka podílející se na zdárném průběhu oplození oocytu spermii
<b>PRM2</b>	protamin 2, látka podílející se na zdárném průběhu oplození oocytu spermii
<b>QR-PCR</b>	<i>real-time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> , volné kyslíkové radikály
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> , ribonukleová kyselina
<b>SHBG</b>	<i>Sex Hormone Binding Globuline</i> , gen výrazně ovlivňující plodnost muže
<b>TEM</b>	<b>Transmisní Elektronová Mikroskopie</b>
<b>VVV</b>	vrozená vývojová vada plodu
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> , Světová zdravotnická organizace
<b>ZIFT</b>	<i>Zygote Intra- Fallopian Transfer</i> , transfer zygoty do vejcovodů
<b>ZP</b>	<i>Zona Pellucida</i> , glykoproteinový obal vajíčka

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Normální a snížená plodnost páru</b>	<b>10</b>
2.1	Snížená plodnost ženy	11
2.1.1	Věk ženy	11
2.1.2	Snížená ovariální rezerva	11
2.1.2.1	Deplece folikulů v ovariích	12
2.1.2.2	Dysfunkce folikulů v ovariích	12
2.1.3	Syndrom polycystických ovarií	14
2.1.4	Onemocnění pohlavních orgánů ženy	15
2.1.4.1	Snížená plodnost děložního původu	15
2.1.4.2	Endometrióza	15
2.1.4.3	Cervikální onemocnění	16
2.1.4.4	Neprůchodnost vejcovodů	16
2.2	Snížená plodnost muže	16
2.2.1	Spermiogram	17
2.2.2	Kryptorchizmus	19
2.2.3	Varikokéla	19
2.3	Vyšetření imunity	20
<b>3</b>	<b>Gametogeneze</b>	<b>21</b>
3.1	Gametická meióza	21
3.1.1	I. zrací dělení, heterotypické dělení, redukční dělení	21
3.1.2	II. zrací dělení, homeotypické dělení, ekvační dělení	24
3.2	Spermatogeneze	25
3.2.1	Sertoliho buňky	26
3.2.2	Spermie	26
3.3	Oogeneze	27
3.3.1	Oocyt	28
<b>4</b>	<b>Proces oplození</b>	<b>30</b>
4.1	Průběh oplození	30
4.1.1	Spontánní koncepce	30
4.1.2	Funkce <i>cumulus oophorus</i>	31
4.1.3	<i>Zona pellucida</i> a průběh akrozomální reakce	32
4.2	Vznik ženského a mužského prvojádra	34



4.3	Vliv volných kyslíkových radikálů na proces oplození.....	35
<b>5</b>	<b>Vybrané metody asistované reprodukce.....</b>	<b>37</b>
5.1	Transfer gamet nebo zygot do vejcovodů.....	37
5.2	<i>In vitro</i> fertilizace – klasická metoda.....	37
5.3	Mikromanipulační techniky.....	39
5.3.1	Itracytoplasmatická spermatická injekce.....	39
<b>6</b>	<b>Vývoj embryí.....</b>	<b>42</b>
6.1	Cytokineze mitotického dělení.....	42
6.1.1	Fragmenty v cytoplazmě.....	43
6.2	Průběh dělní embrya v prvních pěti dnech.....	44
6.3	Asistovaný <i>hatching</i> .....	48
6.3.1	Mechanické narušení <i>zony pellucidy</i> .....	48
6.3.2	Narušení <i>zony pellucidy</i> pomocí Tyrodova roztoku.....	49
6.3.3	Narušení <i>zony pellucidy</i> laserem.....	49
6.3.4	Enzymatické odstranění nebo ztenčení <i>zony pellucidy</i> .....	50
6.4	Hodnocení kvality embryí.....	50
6.4.1	Biochemická kritéria pro výběr embrya.....	51
6.4.2	Morfologické parametry pro výběr embrya.....	51
6.4.3	Kombinovaná forma hodnocení – kvalita embryí a rychlost nástupu dělení.....	52
6.4.4	Biopsie blastomery nebo pólového tělíska pro preimplantační genetickou diagnostiku.....	53
6.4.5	Délka kultivace a její vliv.....	55
<b>7</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Materiál a metody.....</b>	<b>58</b>
8.1	Charakteristika souboru.....	58
8.2	Postup hodnocení souboru.....	60
8.3	Statistická hodnocení.....	62
<b>9</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>67</b>
10.1	Vstupní parametry.....	67
10.2	Výstupní parametry.....	73
<b>11</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>76</b>
<b>12</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>78</b>

# 1 Úvod

Jedním z životních poslání každého organismu na Zemi je předat dalším generacím svůj genetický materiál. Rozmnožovací funkce je pro zachování existence života na Zemi nezbytná. Ani u člověka tomu nemůže být jinak. Již od dávných dob bylo zachování rodu hlavním posláním živých organismů. Od těchto pradávných časů došlo na Zemi k mnoha razantním změnám, ať již v zastoupení fauny a flóry, klimatickým, sociálním nebo politickým, avšak touha po potomstvu je u živočichů, člověka nevyjímaje, věčná.

Není dávno doba, kdy jedinou možností pro pár se sníženou plodností jednoho z partnerů, byla adopce dítěte. S postupným rozvojem v oblasti lékařství a genetiky se objevila pro bezdětné páry naděje mít vlastního potomka - metody asistované reprodukce.

Techniky umělého oplodnění lze považovat za možnosti moderní doby. Prvopočátky postupů umělého oplodnění lidského oocyty sahají do 30. - 40. let 20. století, kdy se prováděly četné pokusy snažící se o *in vitro* fertilizaci, ve veterinární oblasti se tyto postupy objevují dříve. Další výzkum se zabýval vlivy přirozených i uměle syntetizovaných hormonů na proces vývoje vajíčka. Již v 50. - 60. letech došlo na základě předchozích výzkumů k podávání perorálních medikamentů, jež stimulovaly ovulační cyklus. Následovaly mnohé další úspěchy, které v 70. letech vyvrcholily úspěšnou *in vitro* fertilizací, těhotenstvím a porodem. Také v České republice se vědecká pozornost začala na nově zřízených specializovaných pracovištích obracet k metodám asistované reprodukce, ale až v 80. letech minulého století došlo k plnému rozvoji těchto postupů. První dítě počaté při umělém oplodnění na brněnském pracovišti se narodilo za využití metody GIFT roku 1982. V Olomouci byly zaznamenány významné úspěchy metod asistované reprodukce v 90. letech minulého století, roku 1993 se po IVF narodilo zdravé dítě.

Stále nové poznatky a zdokonalování technik asistované reprodukce vyvolávají nejen obdiv, ale i vlnu nevole veřejnosti. Etický a náboženský náhled je často v rozporu s přínosným vědeckým poznáním. Názor si musí každý z nás vytvořit sám. Ale neodborná i vědecká veřejnost by měly mít na paměti, že k procesu početí i jeho výzkumu je potřeba přistupovat s pokorou, aby se s postupem doby věda nestala nepřitelem lidstva, nýbrž aby vždy byla věrným sluhou.

## 2 Normální a snížená plodnost páru

Normální plodností páru se označuje stav, kdy žena otěhotní nejpozději do dvou let při pravidelném nechráněném pohlavním styku (Forti *et* Krausz, 1998). Některé literární zdroje uvádějí, že při normální plodnosti obou partnerů dojde k otěhotnění ženy již do jednoho roku (Chavarro *et al.*, 2007).

Plodnost ženy je ovlivňována souhrou mnoha procesů, např.:

- koordinovaná spolupráce mezi hypotalamem, hypofýzou a vaječníky, která umožňuje dozrávání zpravidla jednoho dominantního vajíčka,
- příprava děložní sliznice na přijetí embrya,
- uvolnění vajíčka z vaječníku,
- volný průchod vajíčka vejcovodem,
- interakce spermie a vajíčka ve vejcovodu, která vede k oplodnění vajíčka,
- transport zygoty vejcovodem až do dělohy, během kterého dojde k rozdělení zygoty na mnohobuněčné embryo,
- zanoření embrya do děložní sliznice a rozvoj placenty.

Plodnost muže je určena schopností:

- produkovat dostatečný počet spermií s normální motilitou, které jsou schopny průchodu z vaginy přes děložní čípek až do vejcovodu ženy,
- spermie oplodnit vajíčko a řadou s tímto jevem spojených chemických procesů.

Jestliže u partnerů dojde k poruše u některého z výše uvedených procesů, snižuje se plodnost páru a klesá pravděpodobnost početí potomka (Mayer *et al.*, 2008).

Pokud v časovém období jednoho až dvou let nedojde u páru k těhotenství, je nezbytné lékařské vyšetření obou partnerů a následná léčba. Ke stanovení diagnózy neplodnosti je nutné přistupovat u každého páru individuálně, např. s ohledem na věk ženy. Její plodnost totiž s rostoucím věkem klesá, proto je vhodné, aby ženy starší 35 let vyhledaly lékařské vyšetření dříve než po jednom roce nechráněného pohlavního styku bez následného otěhotnění (Forti *et* Krausz, 1998).

Českou terminologií je neplodnost označována také jako sterilita. Jedná se o neschopnost ženy otěhotnět. Odlišujeme primární a sekundární sterilitu. Diagnóza primární sterility je stanovena u žen, které nebyly nikdy těhotné. Jestliže bylo u ženy předchozí těhotenství ukončené potratem, bylo uloženo mimo dělohu nebo skončilo porodem, nazýváme následnou neschopnost otěhotnět sekundární sterilitou.

Infertilitou označujeme stav, kdy žena může otěhotnět, ale není schopna dítě donosit. Většinou bývá těhotenství ukončeno samovolným potratem nebo předčasným porodem s následným úmrtím plodu (Řežábek, 2008).

Příčiny snížené spontánní reprodukce mohou být formálně rozděleny do čtyř hlavních kategorií dle stanovené diagnózy:

- snížená plodnost ženy,
- snížená plodnost muže,
- snížená plodnost u obou partnerů,
- nevysvětlitelná neplodnost páru.

Je obtížné stanovit přesné procentuální zastoupení jednotlivých výše uvedených příčin neplodnosti. Uvádí se, že snížená plodnost žen je zastoupena v 35 %, snížená plodnost muže u 30 % párů, až u 20 % dvojic je zjištěn problém u obou partnerů a v 15 % případů nelze stanovit přesný důvod infertility páru (Forti *et* Krausz, 1998).

## **2.1 Snížená plodnost ženy**

Používané vyšetřovací metody u žen se sníženou plodností jsou hysterosalpingografie, pánevní ultrasonografie a pánevní magnetická rezonance. Tyto zobrazovací metody hrají klíčovou roli při diagnostice i následné léčbě. Možných příčin snížené plodnosti je mnoho, proto je nutné důkladně vyšetřit celý pohlavní systém ženy (Steinkeler *et al.*, 2009).

V případě snížené plodnosti lékař zjišťuje obsáhlou anamnézu, která se zaměřuje na dříve prodělaná onemocnění a operace. Plodnost ovlivňují například infekční a virová onemocnění nebo mozkové a cévní onemocnění (Forti *et* Krausz, 1998).

### **2.1.1 Věk ženy**

Věk je u žen jeden z hlavních činitelů snížené plodnosti. Po dosažení 35. roku dochází u žen k výraznému poklesu plodnosti. Ve věkové kategorii 19 - 26 let je výskyt neplodnosti v 8 %, ve věku 27 - 34 let 14 % a ve skupině 35 - 40 let se neplodnost vyskytuje až v 18 % (Dunson *et al.*, 2004).

### **2.1.2 Snížená ovariální rezerva**

Jednou z nejčastějších příčin snížené plodnosti u žen v reprodukčním věku je ovulační dysfunkce, která naruší nebo zcela znemožní reprodukční cyklus (Corabian *et* Scott, 2004). Patofyziologické mechanismy, které zapříčiňují sníženou

ovariální rezervu, lze rozdělit do dvou hlavních skupin poruch, deplece folikulů a dysfunkce folikulů v ovariích (Hudeček *et al.*, 2010).

### **2.1.2.1 Deplece folikulů v ovariích**

Deplece folikulů v ovariích je zapříčiněna chybným vývojem během šestého gestačního týdne vývoje plodu, kdy se z entodermy žloutkového vaku vytváří zárodečné buňky, které migrují do genitální lišty. Následuje rychlé mitotické dělení oogonií a poté meióza s přeměnou oogonií na primární oocyty. V období 28. týdne nitroděložního vývoje plodu už oogonií nepřibývá. Maximálního počtu dosahují zárodečné buňky ve 20. týdnu prenatalního vývoje, kdy jich je přibližně 7 milionů, následnou redukcí jejich počet klesá a v době porodu zůstává v ovariích asi 300 tisíc zárodečných buněk. Proces, který redukuje počet zárodečných buněk v těle, je folikulární atrezie. U žen s předčasným ovariálním selháním je zrychlená folikulární atrezie většinou podmíněna geneticky. V menším počtu případů dochází k primárně redukovanému počtu zárodečných buněk, který může být zapříčiněn například chybnou migrací zárodečných buněk (Hudeček *et al.*, 2010).

### **2.1.2.2 Dysfunkce folikulů v ovariích**

Dysfunkce folikulů v ovariích může být způsobena jejich rezistencí ke stimulaci gonadotropními hormony - syndrom rezistentního ovaria. Příčinou této poruchy mohou být autoimunitní, receptorové a postreceptorové defekty pro gonadotropiny nebo nefunkčnost některých enzymů (Hudeček *et al.*, 2010). Proces ovulace je řízen mnoha hormony, jejichž činnost musí být vzájemně dokonale synchronizována. Mezi gonadotropní hormony patří folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), které stimulují vaječníky k produkci dalších pohlavních hormonů a podporují zrání a uvolnění ženských pohlavních buněk. Pod vlivem FSH dochází ve vaječnicích k vývinu několika folikulů, jejichž obaly produkují estrogény. Stoupající hladina estrogenu v těle stimuluje vývoj endometria a zároveň způsobuje inhibici činnosti hypofýzy, dochází ke snížení sekrece FSH. Po dozrání zpravidla jednoho dominantního folikulu dojde k uvolňování LH. Vajíčko uvnitř dominantního folikulu dozrává a zároveň se oslabuje stěna folikulu. Dochází k uvolnění vajíčka neboli k ovulaci (Corabian *et Scott*, 2004).

Ovulaci lze prokázat např. vzrůstem bazální teploty. Zvýšení tělesné teploty je způsobeno činností hormonu progesteronu, který je produkován žlutým tělískem. Teplota v pochvě je pravidelně měřena (za standardních podmínek) a zaznamenávána.

Tento způsob je vhodný především k samovyšetření. Proběhlou ovulaci lze prokázat z krve stanovením hladiny progesteronu 21. den menstruačního cyklu. Dalším hormonem, který v období ovulace narůstá, je lutinizační hormon (LH) (Rob *et al.*, 2008).

Jakékoliv narušení interakcí mezi hormony produkoványi hypotalamem, hypofýzou a vaječníky, vede k ovulační dysfunkci (ovulace neprobíhá a nedostaví se menzes - amenorhea, nebo je cyklus nepravidelný – oligomenorhea). U žen postižených ovulační dysfunkcí byla diagnostikována jedna z následujících hormonálních poruch:

- hypogonadotropní normoprolaktinemická ovariální insuficience, dle WHO skupina 1
- normogonadotropní normoprolaktinemická ovariální insuficience, dle WHO skupina 2
- hypergonadotropní ovariální insuficience, dle WHO skupina 3
- hyperprolaktinemická ovariální insuficience.

V populaci se nejčastěji vyskytují hormonální poruchy klasifikované podle WHO jako skupina 1 a 2 (30 %) (Corabian *et Scott*, 2004). Hypogonadotropní normoprolaktinemická ovariální insuficience se vyznačuje sníženou sekrecí FSH a následně i LH. Normogonadotropní normoprolaktinemická ovariální insuficience se projevuje sníženou hladinou gonadotropiny uvolňujícího hormonu (gonadoliberin, GnRH1), poruchou luteální fáze menstruačního cyklu a dalšími mnoha dysfunkcemi, které se řadí do skupiny 1 i skupiny 2, například anovulační cyklus nebo hyperandrogenemie (Abbott *et al.*, 2004). Anovulační neplodnost je stav, kdy nedochází k prasknutí stěny folikulu a následnému uvolnění vajíčka, což je zapříčiněno hormonální nerovnováhou v těle ženy (Corabian *et Scott*, 2004). Dochází-li k hyperandrogenemii, je zvýšená hladina mužských pohlavních hormonů - testosteronu, androstendionu a dehydroepiandrosteronu (Borovský *et Krištůfková*, 2009). Při hypergonadotropní ovariální insuficienci je zvýšená hladina FSH i LH, která se projevuje například primárním selháním vaječnicků (Abbott *et al.*, 2004). Poslední skupinou hormonálních poruch ovulačního cyklu je hyperprolaktinemická ovariální insuficience, která je způsobena zvýšenou hladinou prolaktinu v krvi. V případě nálezu zvýšeného prolaktinu je nutné vyloučit fyziologické příčiny hyperprolaktinemie (gravidita, laktace, stres, hypoglykemie, dráždění prsních bradavek nebo pohlavní styk) a farmakologické příčiny (estrogeny, psychofarmaka, opiáty, narkotika, aj.) (Borovský *et Krištůfková*, 2009).

### 2.1.3 Syndrom polycystických ovarii

Syndrom polycystických ovarii (PCOS) je endokrinopatie, která postihuje 5 – 10 % žen ve fertilním věku. Nejedná se o chorobu přesně vymezenou, PCOS je heterogenní onemocnění s širokým spektrem fenotypických manifestací (Vrbíková, 2003). Diagnostika PCOS je obtížná, jelikož se u všech pacientek neobjevuje stejná míra projevu znaků tohoto onemocnění (Corabian *et* Scott, 2004).

V současné době je PCOS definována *National Institute of Health* (NIH 1990, USA) jako stav charakterizovaný chronickou anovulací a hyperandrogenémií (Vrbíková, 2003). Na základě této definice lze PCOS zařadit do skupiny 2, dle WHO, normogonadotropní normoprolaktinemická ovariální insuficience (Corabian *et* Scott, 2004). Dříve byl PCOS diagnostikován sonograficky podle Adamse výskytem osmi a více subkapsulárně uložených folikulárních cyst o průměru do 10 mm a zvýšeným podílem ovariálního stromatu nad 25 % objemu ovaria (Vrbíková, 2003).

V současné době je diagnostika PCOS založena na kombinaci ultrazvukového vyšetření a biochemických kritérií (Corabian *et* Scott, 2004), spolu s klinickými projevy hyperandrogenizmu anebo oligoamenoreou. Žena s PCOS může mít jen jeden nebo všechny z následujících znaků a to v různém stupni projevu:

- typický polycystický vzhled ovarii
- tonická hypersekrece LH v adenohipofýze
- ovariální nadprodukce androgenů
- inzulinová rezistence
- hypersekrece inzulinu
- snížená sekrece růstového hormonu
- obezita.

Ženy s diagnostikovaným PCOS mají nepravidelný menstruační cyklus, obvykle se u nich vyskytuje oligoamenorea nebo sekundární amenorea, avšak PCOS může být i příčinou primární amenorey. U takto postižených žen často dochází k anovulační sterilitě nebo vyšší potratovosti, hlavně v rané fázi gravidity. Obezita doprovází PCOS ve 20 – 80 % případů a výrazně pozměňuje klinický obraz onemocnění, jelikož obezita sama představuje vyšší riziko výskytu gynekologických poruch (sterilita, poruchy menstruačního cyklu, porodní komplikace, aj.) (Vrbíková, 2003).

#### **2.1.4 Onemocnění pohlavních orgánů ženy**

Onemocnění ženských pohlavních orgánů jsou různá, objevují se abnormality ve stavbě i funkci vaječnicků, dělohy nebo děložního čípku. Při diagnostice jsou využívány zobrazovací vyšetřovací metody, např. hysterosalpingografií lze hodnotit jak průchodnost vejcovodů, tak vývojové vady dělohy, které však vyžadují další podrobná vyšetření metodami pánevní ultrasonografie nebo pánevní magnetické rezonance (Steinkeler *et al.*, 2009). V současnosti se stále více využívá endoskopických metod - laparoskopie (LSK) a hysteroskopie (HSK), které kromě diagnostiky umožňují i operativní řešení nalezených abnormalit (převzato: <http://vnl.xf.cz>).

##### **2.1.4.1 Snížená plodnost děložního původu**

Abnormální stavba dělohy je příčinou snížené plodnosti v 3 - 6 % všech případů. Hlavní patologické změny těla dělohy jsou myom, děložní malformace a Ashermanův syndrom. Děložní myomy patří z klinického hlediska do skupiny nádorů, jejichž počet, velikost a poloha jsou velmi variabilní. Mohou způsobovat krvácení, bolesti v oblasti pánve a snižují plodnost. U malformací dělohy se provádí chirurgická korekce dělohy. Ashermanův syndrom se projevuje vznikem sekundárních nitroděložních srůstů, léčba spočívá v rozrušení srůstů a následném podávání estrogenů, které zabezpečí regeneraci endometria (Lampé, 1988).

##### **2.1.4.2 Endometrióza**

U pacientek postižených endometriózou je nalezena tkáň ektopického vzhledu a chování endometria mimo dělohu. Tato tkáň se může nacházet kdekoliv, kromě srdce a sleziny, nejčastěji však postihuje oblast pánve, vaječníky nebo pánevní pobřišnici. Velikost endometriláních cyst se mění v závislosti na hormonálních změnách během menstruačního cyklu (Steinkeler *et al.*, 2009). Endometrióza se projevuje silnou bolestí v oblasti pánve, druhotným projevem je snížená plodnost ženy, a to i v případech, kdy anatomie vaječnicků a vejcovodů zůstává nezměněna (Čepický *et* Líbalová, 2007). Endometrióza postihuje 25 - 50 % žen se sníženou plodností (Rob *et al.*, 2008).

Léčebnou terapií je odstranění ložisek endometriózy a následné užívání léčiv, například kombinované hormonální antikoncepce, aplikace depotních gonadoliberinů, které způsobují atrofii endometria (Čepický *et* Líbalová, 2007).



### **2.1.4.3 Cervikální onemocnění**

Hlen, který je produkován v období ovulace a který uzavírá děložní hrdlo, může negativně ovlivňovat pohyb spermií směrem k oocytu. Např. se zde mohou nacházet protilátky proti spermiím. Tyto protilátky tím, že se navážou na spermie, mohou způsobit jejich znehybnění, shlukování nebo je dokonce usmrtit. Mohou se navázat na akrosom spermií, čímž znemožní splnutí s vajíčkem. Léčba spočívá ve snaze snížit tvorbu protilátek podáváním kortikoidů současně s chráněným pohlavním stykem po několik měsíců, řešením může být intrauterinní inseminace, kdy jsou promyté spermie vloženy přímo do dutiny děložní, čímž je zabráněno styku spermií s děložním hlenem (Naz, 2006).

### **2.1.4.4 Neprůchodnost vejcovodů**

Neprůchodnost vejcovodů je příčinou snížené plodnosti u 30 - 40 % pacientek (Steinkeler *et al.*, 2009). Tento stav může mít mnoho příčin, mezi ty nejčastější patří opakované záněty v oblasti malé pánve, mimoděložní těhotenství, endometrióza na pobřišnici nebo i komplikovaný průběh zánětu slepého střeva. Může dojít k postižení kterékoliv části vejcovodu, nejčastěji však k uzavření dochází na břišním konci. Vzniklá dutina ve vejcovodu je vyplněna tekutinou, která vejcovod rozšiřuje a zvětšuje, dochází až ke vzniku různě velkého kyjovitého útvaru tzv. sactosalpinx.

K obnovení správné průchodnosti vejcovodu lze provést mikrochirurgickou operaci, po které však otěhotní asi jen 10 % žen. S rozvojem metod asistované reprodukce se snížil počet těchto prováděných zákroků. Je prokázáno, že tekutina sactosalpinxu negativně ovlivňuje úspěšnost asistované reprodukce, proto je doporučeno, aby byl takto postižený vejcovod odstraněn (Řežábek, 2008).

## **2.2 Snížená plodnost muže**

V celosvětovém měřítku je plodnosti muže věnována menší pozornost než plodnosti žen. Jedním z důvodů je, že lékařské vyšetření plodnosti muže je interdisciplinární záležitostí. Různými příčinami se zabývají pediatři, morfologové, gynekologové, endokrinologové, urologové, dermatovenerologové, toxikologové i sexuologové. Podíl muže na infertilitě páru je minimálně 20 %, avšak uvádí se, že dosahuje až 40 % (Zvěřina, 2010).

Mužská plodnost závisí na dostatečné produkci spermií do varlat, volném průchodu spermií semennými cestami a konečné koncentraci spermií při styku s vajíčkem

(Lewis, 2003). Snížená plodnost mužů je tedy úzce spjata s kvalitou spermatu. Nedostatečný počet spermií nebo jejich horší pohyblivost v porovnání s hodnotami základních vlastností normálního spermioqramu (Tab. 1) je často důsledkem infekce a následným zánětem varlat, nadvarlat nebo vývodných semenných cest (O'Brien *et al.*, 2004). Na kvalitu spermatu mají vliv také toxiny přijímané jedincem z životního prostředí, účinky některých léčiv, např. užívání antihistaminik, která snižují objem semenné tekutiny, či nesestouplé varle. Další možné důvody poruchy plodnosti muže mohou být déle trvající horečka, stres, nedostatek spánku, těsné spodní prádlo nebo nadměrné požívání alkoholu, nikotinu, marihuany či jiných návykových látek (Lewis, 2003). Je nutné se při stanovování příčiny snížené plodnosti muže zaměřit i na možné endokrinní poruchy, stanovením hladiny jednotlivých hormonů (O'Brien *et al.*, 2004). Celkové hodnocení plodnosti muže se musí zakládat na důkladném fyzickém vyšetření jedince a z vyšetření spermioqramů, které se provádějí opakovaně v několikaměsíčních intervalech (Zvěřina, 2010).

Tab. 1: Hodnoty základních vlastností normálního spermioqramu  
(převzato: WHO, 2010)

Objem ejakulátu	1,4 - 1,7 ml
Koncentrace spermií	12 - 16. 10 <sup>6</sup> /1 ml
Celkový počet spermií v ejakulátu	33 – 46 mil.
pH ejakulátu	≥7,2
Celková pohyblivost spermií	38 – 42 % progresivní i neprogresivní pohyb
Progresivní pohyblivost spermií	31 – 34 % progresivní pohyb dopředu
Normální morfologie	3 – 4 %

### 2.2.1 Spermioqram

Kvalitu spermatu charakterizuje vypracovaný spermioqram. Jde o mikroskopické vyšetření vzorku spermatu. Hodnocen je počet spermií v jednom mililitru, dále jejich pohyblivost a tvar (O'Brien *et al.*, 2004). Definice normozoospermie dle WHO (Tab.1) vychází z ejakulátu získaného masturbací po předchozí dvou až sedmidenní pohlavní abstinenci, poté je vzorek uchováván při 20°- 37°C a jsou hodnoceny jeho makroskopické i mikroskopické parametry. Zdravý ejakulát je homogenní a šedě opaleskujícího se vzhledu. Viskozita ejakulátu je hodnocena pomocí plastové injekční stříkačky s širokým

hrdlem. Jako viskózní je hodnocen vzorek spermatu, který po vypuštění ze stříkačky tvoří vlákna dlouhá 2 cm. Množství ejakulátu se určuje zvážením odběrové zkumavky před a po odebrání vzorku. Hodnocení pohyblivosti spermií se provádí 30 – 60 minut po odběru vzorku při fázovém kontrastu a zvětšení 200 – 400x. Pohyb spermií lze rozdělit do tří skupin:

- progresivně pohyblivé (aktivní pohyb vpřed nebo ve velkých kruzích),
- neprogresivně pohyblivé (pohyb na místě, točení v malých kruzích apod.),
- nepohyblivé.

Morfologie je odčítána z nátěrového vzorku spermatu, který je po zaschnutí, zafixování a zbarvení pozorován při zvětšení 1000x pod imerzním olejem. Hodnotí se 200 spermií ve dvou alikvotních vzorcích, počítá se procentuální zastoupení normálních a abnormálních forem, výsledná odchylka je porovnávána s tabulkou (Tab. 1). Popis normální morfologie:

- **Hlava** - pravidelný oválný tvar, jasná kontura, dobře viditelný akrozómální úsek, který zaujímá 40 - 70 % objemu hlavy, je bez vakuol (max. 2 malé vakuoly), postakrozómální úsek bez vakuol,
- **Bičík** - spojení s hlavou by mělo být souměrné, bez vyloučené cytoplazmy, bez cytoplazmatických kapek, nemá být zalomený, ztlustělý ani stočený, ideální délka bičíku by měla být 10x delší než délka hlavy spermie (WHO, 2010).

Při interpretaci kritérií **normozoospermie** je nutné zachovávat si obezřetnost. Teprve výrazná odchylka koncentrace spermií od hodnoty 20 mil./1 ml může být příčinou snížené plodnosti muže (Zvěřina, 2010).

Dle vyhodnocení spermioqramu lze diagnostikovat **azoospermii**, kdy se jedná o ejakulát bez přítomnosti spermií. Dále lze stanovit **oligospermii**, kdy je počet spermií v jednom mililitru ejakulátu pod 20 mil/1 ml. Pohyblivost spermií pod 40 % je označována za **astenospermii**. Jsou-li spermie více jak z 60 % netypického tvaru, jedná se o patologii zvanou **teratospermie** (Avidan *et al.*, 2003).

Při hodnocení spermilogických parametrů je nutné postupovat dynamicky a celé vyšetření provádět opakovaně v jistých časových intervalech. Zvláště u patospermických ejakulátů je vysoká variabilita sukcesivních hodnot spermioqramů, proto se doporučuje provádět kontrolní vyšetření s odstupem několika měsíců, jelikož cyklus spermiogeneze trvá asi 70 dnů.

Vysvětlit patospermii u každého muže z páru trpícího sníženou plodností se nepodaří. Řada oligospermii a astenospermii zůstává idiopatických. Tito muži trpí nekvalitní a málo výkonnou spermiogenezi, kdy dochází k ustrnutí na nižším stádiu spermiogeneze (Zvěřina, 2010).

### **2.2.2. Kryptorchismus**

Jedná se o vývojovou vadu, která může v dospělosti vést až ke snížené schopnosti reprodukce. Porucha je charakteristická u chlapců po narození nepřítomností varlete v šourku. Vyskytuje se u 3,4 – 5,8 % donošených novorozenců (Kočvara, 2004). Poruchy sestupu varlete jsou faktorem snižujícím normální schopnost reprodukce i v případě, že byly v dětství včas hormonálně nebo chirurgicky léčeny (Zvěřina, 2010).

Během sestupu varlete dochází k jeho náhlému zastavení. Tento stav označujeme jako retinované varle, které lze najít v místech dráhy jeho sestupu. Pojmem anorchie označujeme stav, kdy lze nalézt slepě končící spermatické cévy a chámovod v různém stupni vývoje. Je prokazatelné, že v období embryonálního vývoje muselo být varle přítomno, protože došlo k vývoji mužského zevního i vnitřního genitálu.

Od kryptorchizmu je třeba odlišit retraktilní varle, které je vytlačováno ze své intraskrotální polohy, avšak jemnou manipulací může být staženo zpět do šourku, jeho funkce jsou zachovány v normě.

Léčba začíná po šesti měsících života, protože již po třetím měsíci dochází k sestupu varlete jen u minima případů. Kryptorchismus vyskytující se u chlapce staršího než jeden rok je příčinou prudkého poklesu indexu fertility. Jestliže byl nález oboustranný, je index fertility ještě snížen. Od normální populace se liší i fertilita druhostranně sestouplého varlete u jednostranného kryptorchizmu. Prepubertální varle, u kterého nedošlo k sestupu, již nemá žádné zárodečné buňky. Infertilita byla zaznamenána u 32 % jednostranných retencí a u 59 % oboustranných retencí (Kočvara, 2004).

### **2.2.3 Varikokéla**

Při onemocnění varikokélou dochází ke zmnožení žilních pletení za varletem a nad varletem. Důsledkem tohoto onemocnění je horší průchod krve varletem, protože dochází ke krevnímu městnání. Dalším negativním vlivem je zhoršená termoregulace varlete, což je důsledek opětovného návratu teplé abdominální žilní krve do skróta. Při tomto onemocnění dochází při tělesné námaze nebo při zvedání břemene k návratu krve zpět do tkáně, ze které odtekla. Odkysličená krev je již zbavena výživných

látek a pouze zhoršuje přitékání okysličené tepenné krve bohaté na živiny. Varikokéla může vést k poruše spermatogeneze a ke snížení plodnosti muže. Pacienty většinou sužuje nepříjemná bolest, která je popisována pocity tíhy a tepla ve skrótu (Hauser *et al.*, 2001). Varikokéla je negativním faktorem působícím na plodnost muže, avšak nebylo objektivně potvrzeno, že operace tohoto onemocnění má příznivý vliv na fertilitu (Zvěřina, 2010).

### **2.3 Vyšetření imunity**

Pouze imunologický faktor neplodnosti se vyskytuje u 2 – 3 % párů. Vyšetření imunologické příčiny sterility spočívá v detekci různých druhů protilátek, které se mohou vyskytovat v krvi muže i ženy, v seminální plazmě muže či ovulačním hlenu nebo folikulární tekutině ženy.

K nejlépe prostudovaným patří antispermatozoidální protilátky, protilátky antiovariální, proti zona pellucida či antifosfolipidové protilátky. Vytvořené protilátky zabraňují pohybu spermií k oocyту, procesu splnutí vajíček se spermií při fertilizaci či negativně ovlivňují časný vývoj embrya nebo zvyšují riziko potratu.

Pro vzniklý zárodek je velice nebezpečná také tzv. buňkami zprostředkovaná imunita. Jedná se například o účinek cytotoxických lymfocytů, embryotoxických a zánětlivých cytokinů, adhezních molekul aj., které jsou méně antigenně specifické. Imunitní reakce spuštěná proti spermiím může ovlivňovat i buňky (zárodečné, trofoblastu) a může být příčinou potratu (Naz,2006).

### 3 Gametogeneze

U diploidních organismů obsahují somatické buňky dvě sady homologních chromozómů, jedna z nich je zděděná po matce – maternální a druhá po otci – paternální. Každá buňka tak nese dvě kopie každého genu. Jednotlivé sady chromozómů nejsou geneticky identické, jelikož nesou různé varianty mnoha genů. Z této skutečnosti vyplývá jejich označení homologní chromozómy neboli homology, jsou si podobné, avšak nejsou identické. Buňky pohlavní neboli gamety jsou haploidní, obsahují pouze jednu sadu chromozómů. Haploidní zárodečné buňky vznikají meiózou z diploidních somatických buněk a nesou jeden chromozóm od každého typu. Gameta získá maternální nebo paternální kopii každého genu, nikdy ne obě dvě. Během procesu meiózy se chromozómy ze dvou sad náhodně rozdělí. Jakmile dojde ke splnutí haploidních gamet, vzniká diploidní buňka – oplozené vajíčko neboli *zygota*. *Zygota* se složitě vyvíjí v nového jedince, který má odlišnou sadu chromozómů od obou rodičů (Alberts *et al.*, 1998).

#### 3.1 Gametická meióza

Základním biologickým procesem gametogeneze je meióza neboli redukční dělení buňky. Tento proces je typickým znakem pro pohlavní rozmnožování. Proces meiózy se skládá ze dvou základních fází – I. heterotypické (Obr. 1) a II. homeotypické zrací dělení (Obr. 2) (Cohen *et Holloway*, 2010). Každá ze dvou základních fází meiózy se skládá z dalších dílčích fází:

- profáze,
- metafáze,
- anafáze,
- telofáze (Nečas *et al.*, 2000).

##### 3.1.1 I. zrací dělení, heterotypické dělení, redukční dělení

Pro první zrací heterotypické dělení je charakteristická dlouhá a komplikovaná **profáze**, která bývá značena jako profáze I (Cohen *et Holloway*, 2010). Profáze I časově zahrnuje asi 90 % doby trvání meiózy a probíhá v jádře, které si zachovává jaderný obal i jadérko. Tato fáze se skládá z pěti etap:

- leptotene,
- zygotene,

- pachytene,
- diplotene,
- diakinese.

Ve fázi leptotene mají chromozómy charakter dlouhých tenkých vláken, jelikož proces spiralizace chromozómů a následná dehydratace je teprve na počátku. Chromozómy jsou svými konci orientovány k jaderné bláně, toto místo připojení konců chromozómů k jaderné bláně je zesílené a označuje se jako upínací ploténka.

Ve fázi zygotene jsou chromozómy lépe pozorovatelné, jelikož dochází k jejich zkracování a celkové spiralizaci. Párové homologní chromozómy se k sobě přibližují, toto seskupení je označováno jako tzv. *synapse* neboli zápoj. Celým procesem nastává pouze zdánlivá redukce chromozómů, jelikož páry vytváří jeden celek, který se nazývá *bivalent* neboli *geminus*. Fáze párování chromozómů probíhá odlišně u oocyty a spermioocyty. U oocyty dochází k párování dvou chromozómů po celé jejich délce, avšak u spermioocyty je odlišná struktura a velikost chromozómů X a Y. Párování probíhá mezi homologní částí chromozómu X a krátkého úseku chromozómu Y. Toto spojení trvá velice krátce a probíhá na konci zygotene.

Následující fází profáze I je pachytene, která je charakteristická tím, že dochází k další kondenzaci hmoty chromozómů, stávají se viditelné dvě sesterské chromatidy každého z chromozómů. Tento útvar se označuje termínem dvojitý *bivalent* neboli *tetráda*. V této fázi může dojít k překřížení nesesterských chromatid přes sebe za vzniku *chiazmat*. Následně může v místě, kde se nachází *chiazma*, dojít k přetržení původních chromatid. Tyto zlomové plochy se následně napojí tak, že se k chromatidě připojí její původní nebo cizí úsek, čímž dochází k výměně genů a k jejich rekombinaci. Celý tento proces je řízen enzymaticky a nazývá se *crossing-over* neboli překřížení chromozómů. Sídlem multienzymatických systémů jsou rekombinační uzlíky, které mají průměr asi 90 nm a skládají se z vysokomolekulárních proteinů.

K oddělování *bivalentů* dochází během diplotene. Došlo-li ke vzniku *chiazmat*, jsou ve fázi diplotene posouvány až ke koncům chromozómů, čímž dochází k jejich tzv. terminalizaci. *Bivalenty* se nacházejí těsně u jaderné blány.

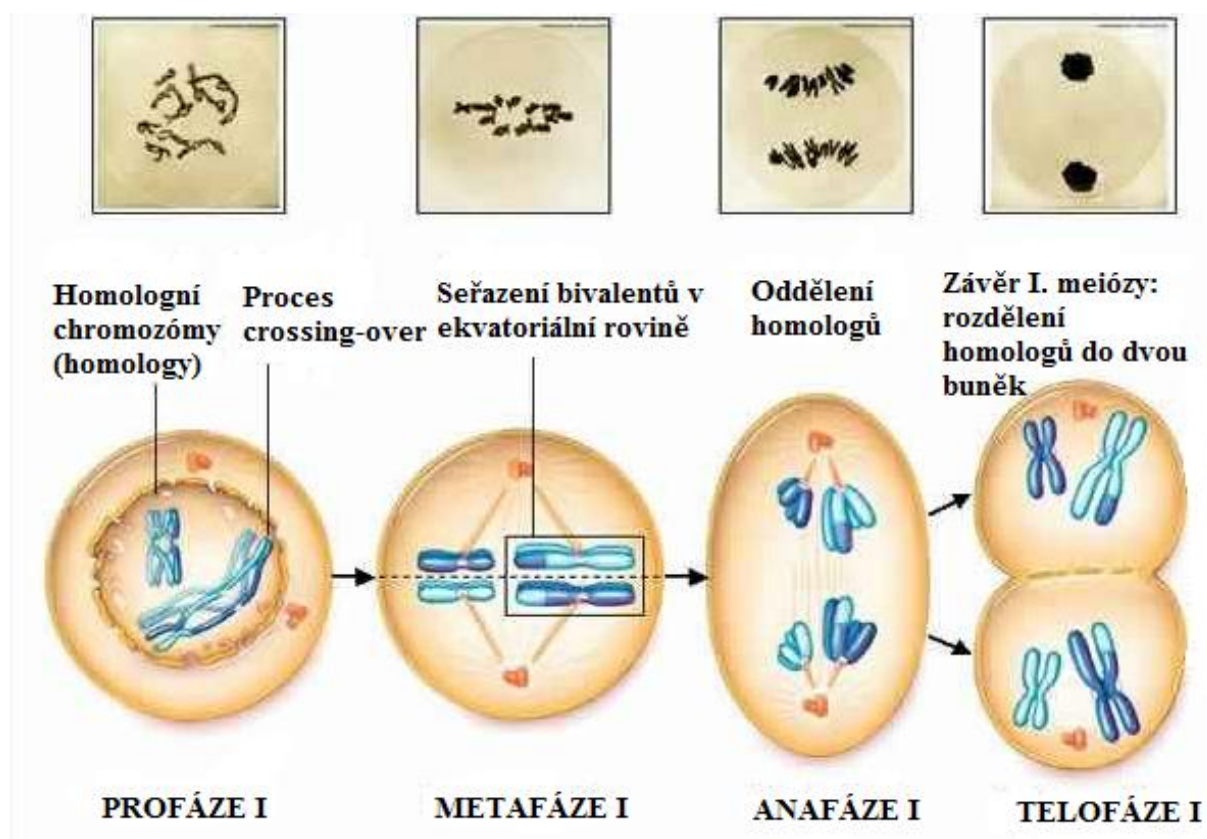
Profáze I končí diakinezí, během které se rozpouští jaderná blána, mizí jadérko a na místě jádra vzniká dělicí vřeténko.

Během **metafáze I** dochází k seřazení *bivalentů* tak, aby terminalizovaná *chiazmata* byla v ekvatoreální rovině, přičemž každá ze dvou centromer jednoho *bivalentu* směřuje k opačnému pólu buňky. Výběr orientace centromer je zcela náhodný. Poté dochází

k napojení mikrotubul dělicího vřeténka na *kinetochory* centromer tak, aby z každého pólu dosahovaly vždy k jednomu z homologických chromozómů. K přerušení *chiazmatického* spojení dochází v průběhu **anafáze** I. Jednotlivé homologní chromozómy se rozdělují a každý směřuje k jinému pólu. Jde o zcela náhodný proces. V této fázi došlo k faktické redukci počtu chromozómů. Každý chromozóm obsahuje dvě chromatidy spojené centromerou.

Poslední fázi I. zracího dělení je **telofáze** I, během níž dochází k *cytokinezi*, po které vzniknou dvě buňky s haploidním počtem dvouchromatidových chromozómů. Chromozómy zůstávají spiralizovány, jelikož nastupuje II. zrací dělení (Nečas *et al.*, 2000).

Během I. fáze zracího dělení zůstávají dvojice homologních chromozómů spojeny a je tomu tak až do konce prvního meiotického dělení, kdy dochází k rovnoměrnému rozdělení chromozómů do dceřiných buněk, které následně vstupují do homeotypické fáze zracího dělení. První fáze zracího dělení je velice důležitá, jelikož až 50 % všech spontánních potratů je způsobeno zásadními chybami během tohoto procesu (Cohen *et Holloway*, 2010).



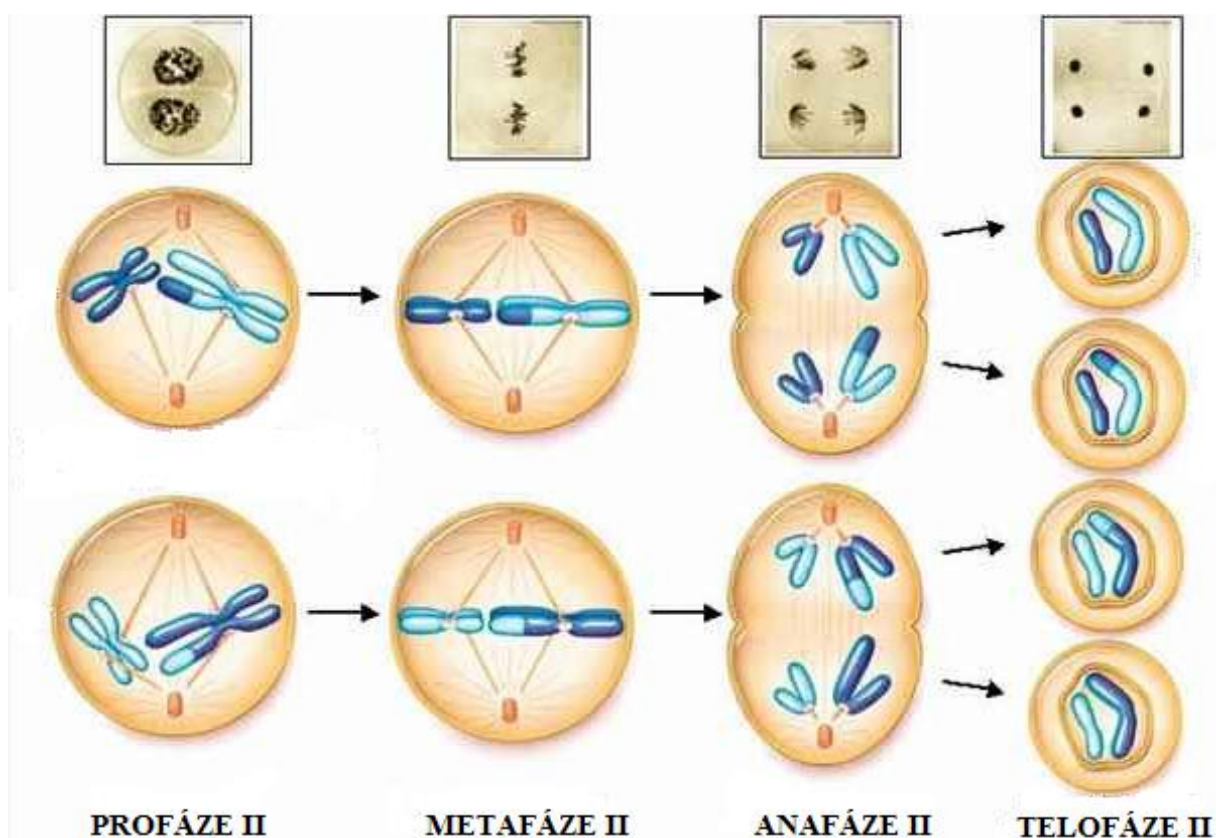
Obr. 1: Průběh I. zracího dělení (převzato: [www.biology.iupui.edu](http://www.biology.iupui.edu))



### 3.1.2 II. zrací dělení, homeotypické dělení, ekvační dělení

Druhé meiotické dělení je dokončením celého procesu vzniku haploidních gamet. Průběh je obdobný s mitózou, avšak podstatným rozdílem je haploidní počet chromozómů, které jsou kratší a jejichž chromatidy se nacházejí dále od sebe než při mitóze. Na konci **profáze II** se vytváří dvě mikrotubulární dělicí vřeténka, která oddělí centromery sesterských chromatid, tím se sesterské chromatidy stávají dceřinými chromozómy uloženými v opačných pólech buňky. Následně proběhne **metafáze II** a **anafáze II**. Celý děj gametické meiózy je ukončen v **telofázi II**, po které proběhne *cytokineze*, čímž vznikají čtyři haploidní pohlavní buňky – spermie a jeden oocyt se 2-3 pólocyty, pólovými tělísky (Nečas *et al.*, 2000).

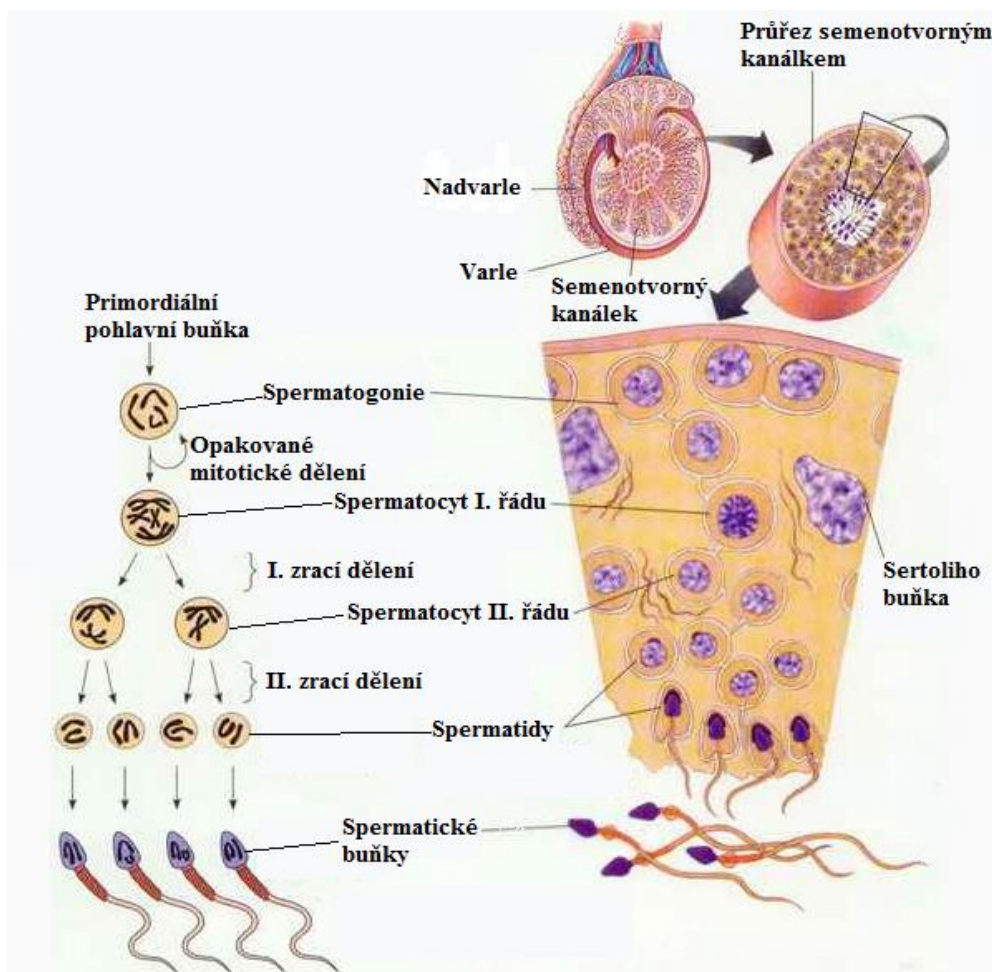
Výzkumy zaměřené na průběh meiózy u člověka ukazují, že je možné klasifikovat rozdíly mezi procesem redukčního dělení u ženy či u muže a to konkrétně ve zdroji meiotických chyb. Až 90 % chromozomálních aneuploidii vznikají u plodu v důsledku chybného průběhu meiózy u matky (Cohen *et Holloway*, 2010).



Obr. 2: Průběh II. zracího dělení (převzato: [www.biology.iupui.edu](http://www.biology.iupui.edu))

## 3.2 Spermatoogeneze

Proces spermatoogeneze (Obr. 3) je velmi složitý, formálně se rozděluje do dvou hlavních etap – spermatocytogeneze a spermatohistogeneze. Na začátku spermatocytogeneze dochází k množení indiferentních buněk za vzniku primitivních semenotvorných kanálků (*tubuli seminiferi contorti*) a podpůrných Sertoliho buněk. Z primordiálních pohlavních buněk, které vcestovaly během předchozích procesů, se vytváří **spermatogenní epitel**, jehož hlavní činností je tvorba **spermatogonií**. Počet spermatogonií je v době porodu značně redukován a k jejich opětovnému nárůstu dochází u mužů v období puberty. V zárodečném epitelu semenotvorných kanálků varlat vznikají ze spermatogonií mitotickým dělením **spermatocyty I. řádu**. Prvním zracím meiotickým dělením vznikají z diploidních spermatocytů I. řádu haploidní **spermatocyty II. řádu**. Během druhého zracího meiotického dělení dojde k dělení každého spermatocytu II. řádu na dvě haploidní **spermatidy**, které během spermatohistogeneze dozrávají ve čtyři **spermie**. Celý tento proces trvá 65 – 75 dnů a každý den jím prochází asi 3 milióny spermatogonií (Campbell *et* Reece, 2008).



Obr. 3: Průběh spermatoogeneze (převzato: [www.ldysinger.com](http://www.ldysinger.com))

### 3.2.1 Sertoliho buňky

Jedná se o velké diploidní somatické buňky, které se nacházejí na bazální membráně semenných kanálků. Sertoliho buňky se výrazně podílejí na stavbě imunitní ochranné hematotestikulární bariéry. Tyto buňky jsou velké a mají nepravidelný tvar. Jejich jádro je velmi dobře patrné. Sertoliho buňky jsou charakteristické prodlouženými mitochondriemi a přítomností tukových kapének. Jejich hlavní funkcí je regulace tvorby a uvolňování spermií, dále vylučování proteinů, které jsou nezbytné pro proces spermiogeneze a správnou činnost varlat, tyto buňky mají také schopnost fagocytózy zbytků buněčných těl a následné recyklace některých důležitých látek (O'Day, 2010).

### 3.2.2 Spermie

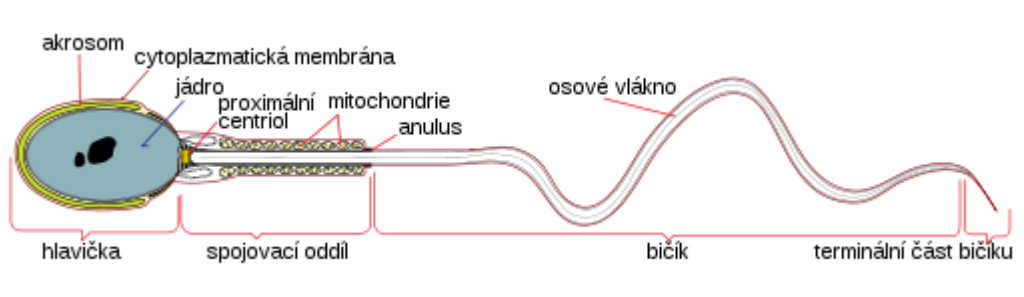
Každá ze stavebních složek spermie má svoji specifickou funkci. Hlavním úkolem spermie je splynout s vajíčkem za vzniku diploidní zygoty. Tělo spermie lze rozdělit do tří základních částí (Obr. 4):

- hlavička,
- střední spojovací oddíl,
- bičík.

V hlavičce spermie je uloženo haploidní jádro a specifické enzymy. Ve střední spojovací části se nachází komplex mitochondrií spirálního tvaru, jež poskytují energii (ATP) nutnou k mobilitě spermií. Bičík se skládá z mikrotubulů, jež jsou uspořádány do 9+2 celků a slouží k pohybu spermie. Na povrchu cytoplazmatické membrány hlavičky spermie se nacházejí receptory, které jsou nutné k biochemickému rozpoznání oocyty. Speciální enzymy, které jsou nezbytné k proniknutí spermie do vajíčka, jsou uloženy ve váčku, který se nazývá akrozóm (O'Day, 2010).

V hlavičce uložené jádro obsahuje DNA, které je pevné až krystalické konzistence. Spermie mají vlastní kompletní multienzymatický proteazóm. Jedná se o válcovitou strukturu, ve které dochází k hydrolytickému štěpení některých vnitrobuněčných proteinů na aminokyseliny nebo peptidy (Barratt *et al.*, 2009). Tato struktura umožňuje speciálně rozklad těch bílkovin, na které se navázal tzv. *ubikvitin*. *Ubikvitin* je malá proteinová jednotka, jejíž kovalentní navázání na jiný protein je signálem pro proteazóm, že má dojít k hydrolyze daného proteinu. Proteolytické jádro proteazómu je označeno jako jednotka 20S, která má prstencovou strukturu. Vnější prstence jsou katalyticky neaktivní, avšak vnitřní prstencové podjednotky vykazují katalytickou činnost. Proteazóm 20S může hydrolyticky rozkládat jiné látky i za nepřítomnosti ATP či *ubikvitinu*. Dojde-li k navázání

regulační podjednotky na proteazóm 20S, vzniká proteazóm 26S, který je výrazně větší. Činnost proteazómu 26S je závislá na spotřebě ATP a často i na přítomnosti *ubikvitinu*. Bylo prokázáno, že celý multienzymatický proteazómový komplex se podílí na procesu fertilizace. Jeho správná funkce je nezbytná při kontaktu spermie se zónou *pellucidou* oocyty, při enzymatických akrozomálních reakcích a přívodu vápenatých iontů, který těmto reakcím předchází (Kong *et al.*, 2009).



Obr. 4: Stavba spermie (převzato: [www.wikipedia.cz](http://www.wikipedia.cz))

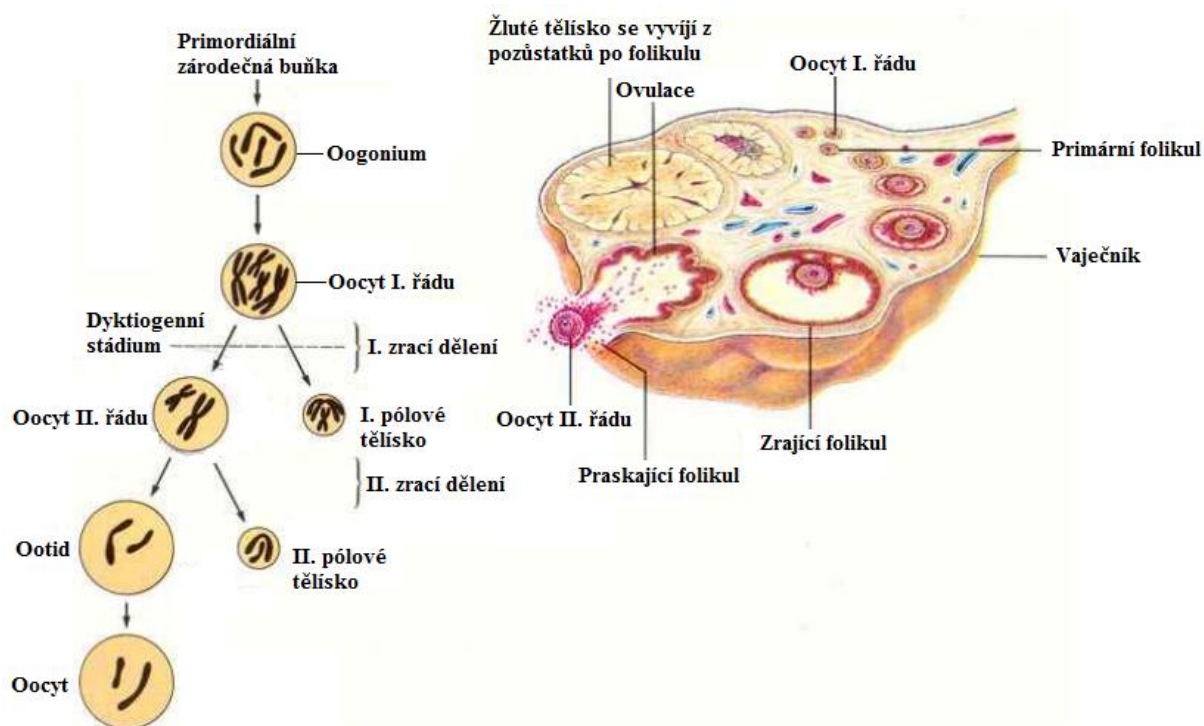
### 3.3 Oogeneze

Průběh oogeneze (Obr. 5) je založen na gametické meióze, stejně jako spermatogeneze, avšak objevuje se tu mnoho odlišností. Celý složitý proces oogeneze probíhá ve vaječnících. Do nich se dostávají *gonocyty* stejným způsobem jako u spermatogeneze. Mitotickým množením primordiálních zárodečných buněk vznikají *oogonie*, jejich tvorba nastupuje na rozhraní 2. - 3. měsíce a končí 6. měsícem prenatálního vývoje. Předpokládá se, že takto vznikne asi 6 – 7 miliónů *oogonií*. Během dalšího vývoje jsou některá *oogonia* obklopena buňkami coelomového epitelu, vznikají tak primární folikuly. Dalším krokem ve vývoji oocyty je první zrací dělení, které nastupuje již v 6. měsíci prenatálního vývoje a zastavuje se v diplotenním stádiu profáze I, za vzniku oocyty I. řádu. Zástava vývoje trvá až do období puberty, toto velmi dlouhé období diplotene se označuje jako *diktyogenní stádium* (Golubovsky *et Manton*, 2005). Celkový počet primárních folikulů v obou vaječnících je 300 000 – 400 000 (Campbell *et Reece*, 2008).

V pubertě dochází vlivem folikulostimulačního hormonu (FSH) ke stimulaci a růstu primárních folikulů, dokončuje se první zrací dělení za vzniku haploidního oocyty II. řádu, haploidního pólového tělíska a pólocyty I. řádu. Poté dochází u oocyty II. řádu k nástupu druhého zracího dělení a vytváří se dělicí vřeténko, avšak dál už druhé meiotické dělení nepokračuje. Tento proces je dokončen až v případě oplození, kdy dojde ke vzniku ootidu

a pólócytu II. řádu a následně samotného oocytu. Obě pólóvá tělíska zanikají (Golubovsky *et* Manton, 2005).

Oocyt je obalen jednou nebo více vrstvami folikulárních buněk - tzv. Graafovým folikulem. Folikul má ochrannou funkci a podporuje i správný vývoj oocytu. Od počátku puberty až do období menopausy dozrává každý měsíc během menstruačního cyklu jeden folikul a v období ovulace uvolňuje oocyt. Buňky folikulu produkují ženské pohlavní hormony estrogény, po vypuzení vajíčka se folikulární buňky ve vaječniku kompaktují a mění se na tzv. *corpus luteum*. Toto tělísko vylučuje estrogény i progesteron. Nedojde-li k oplození oocytu, *corpus luteum* se vstřebává a ve vaječniku dozrává nový folikul (Campbell *et* Reece, 2008).

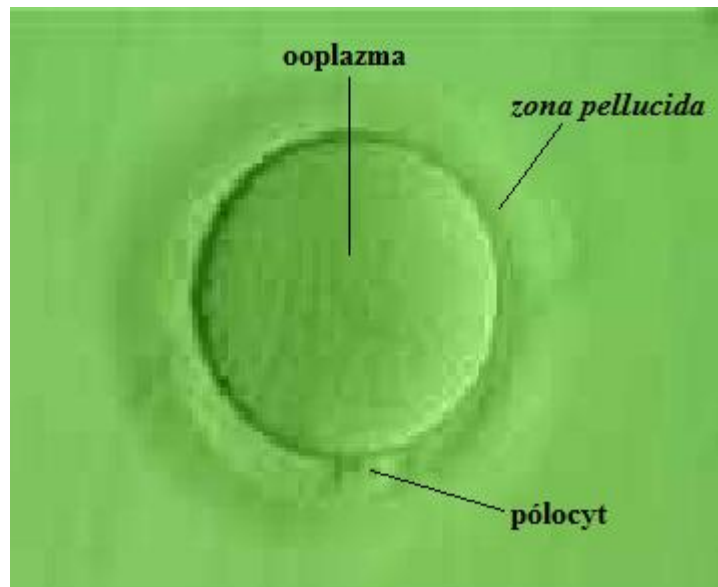


Obr. 5: Průběh oogeneze (převzato: [www.ldysinger.com](http://www.ldysinger.com))

### 3.3.1 Oocyt

Lidský oocyt (Obr. 6) má v průměru 110 – 115  $\mu\text{m}$  a je obalen plasmatickou membránou, která se označuje *oolemma*. Vnější ochrannou vrstvu oocytu tvoří glykoproteinový obal *zona pellucida*, která je široká asi 15 – 20  $\mu\text{m}$ . Tato vrstva se po oplození výrazně ztenčuje. Oblast mezi *oolemmou* a *zonou pellucidou* se nazývá periviteliní prostor. Cytoplazma oocytu je běžně označována jako ooplazma, ve které jsou

uloženy buněčné organely – mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát (Veeck,1999).



Obr. 6: Lidský oocyt (převzato: [www.darovanie.sk](http://www.darovanie.sk))



## 4 Proces oplození

Samčí i samičí pohlavní buňky mnohobuněčných živočichů mají schopnost splývat zpravidla jen v rámci téhož druhu. Obvykle jsou gamety jednoho druhu chráněny před fúzí s gametami jiných druhů. U lidského vajíčka je tato schopnost zaručena přítomností speciální vrstvy tzv. *zony pellucidy* vně plazmatické membrány, která je propustná jen pro lidské spermie. U samčích pohlavních buněk člověka je specifická schopnost oplodnit oocyt podmíněna jejich kapacitací. Jedná se o velmi složitý proces, jehož přesný průběh nebyl dosud detailně prostudován. Při kapacitaci dochází ke změnám v lipidové a glykoproteinové výbavě na plazmatické membráně spermií, které vedou ke zvýšení pohyblivosti spermií i k jejímu výkonnějšímu metabolismu (Nečas *et al.*, 2000).

### 4.1 Průběh oplození

Oplodnění zahrnuje celou řadu buněčných molekulárních reakcí, které umožňují setkání oocytu a spermií, proces kapacitace spermií, proběhnutí akrozomální reakce, vazbu spermií na *zonu pellucidu*, fúzi spermií a oocytu, vznik zygoty a následný vývoj embrya (Depa-Martynów *et al.*, 2007, Van Soom *et al.*, 2002).

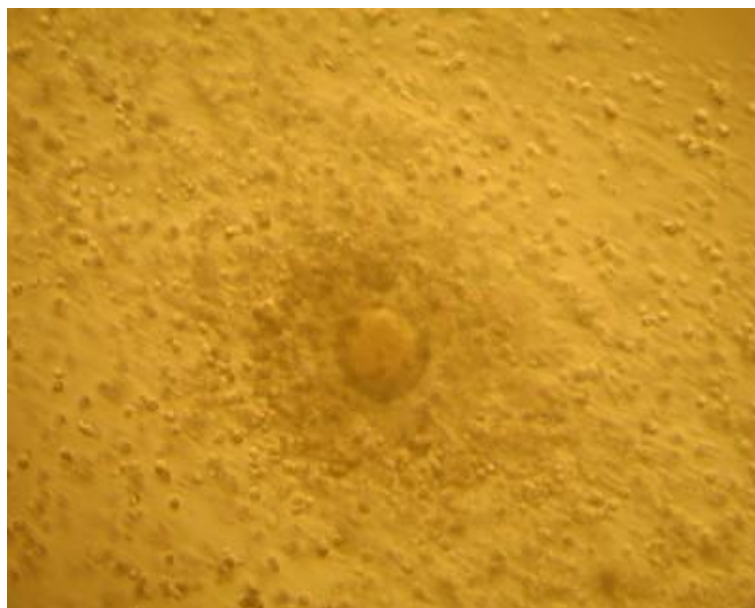
#### 4.1.1 Spontánní koncepce

Poté, co se ejakulát dostane do pochvy, nastává složitá cesta spermií k oocytu. Spermie (průměrná délka 60  $\mu\text{m}$ ) musí projít přes děložní čípek, děložní dutinu, až do vejcovodu a najít jediný oocyt (velikosti 150 – 200  $\mu\text{m}$ ). Koncentrace spermií postupně klesá, počet spermií přítomných v obou vejcovodech se pohybuje v rozsahu 80 – 1400, průměrně se uvádí asi 250 spermií, což představuje pouhých 0,004 % z množství spermií v ejakulátu (Eisenbach *et Tur-Kaspa*, 1999). Folikulární tekutina obsahuje biochemické látky, které napomáhají pohybu spermií a oplodnění vajíčka, také se předpokládá přesná biochemická chemotaxe mezi spermií a oocytem (Fetterolf *et al.*, 1994).

Je otázkou, zda setkání vajíčka a spermií je procesem čistě náhodným, nebo jestli mezi nimi dochází k nějaké „biochemické komunikaci“. *In vitro* bylo zjištěno, že zdravá spermie je schopna chemotaxí reagovat na pre- i postovulační folikulární tekutinu, je vázána na biochemické sekrety produkované buňkami komplexu cumulus oophorus i vlastním oocytem, a že právě chybná biochemická reakce mezi oocytem a spermií může být jednou z příčin snížené plodnosti ženy, muže nebo obou partnerů (Eisenbach *et Tur-Kaspa*, 1999).

#### 4.1.2 Funkce *cumulus oophorus*

Vrstvy granulózních buněk v rostoucím folikulu se podílí na správném růstu a zrání vajíčka. V době ovulace dochází k přeměně části granulózních buněk okolo vajíčka a vzniká buněčný komplex tzv. *cumulus oophorus* a *corona radiata* (Obr. 7). Odstranění těchto buněk může vést ke snížení pravděpodobnosti oplození. Přesné biochemické procesy, kterými spolu komunikují buňky *cumulus oophorus*, *corona radiata* a pohlavní buňky, zatím nejsou známy. Existují však různé teorie, které se snaží funkci těchto buněk vysvětlit, např. že větší množství buněk zabezpečuje mechanický záchyt spermií, že tyto buňky zabezpečují příznivé mikroklima pro kapacitaci, akrozomální reakci spermií a jejich průnik do vajíčka, nebo že buňky *cumulus oophorus* a *corona radiata* zabraňují patofyziologickým změnám v *zoně pellucidě* nebo cytoplazmě vajíčka, které by mohly negativně ovlivnit proces oplození.



Obr. 7: Vajíčko je po odběru z folikulu vaječníku obklopeno buňkami *cumulus oophorus* (převzato: [www.babyonline.cz](http://www.babyonline.cz))



#### 4.1.3 *Zona pellucida* a průběh akrozómalní reakce

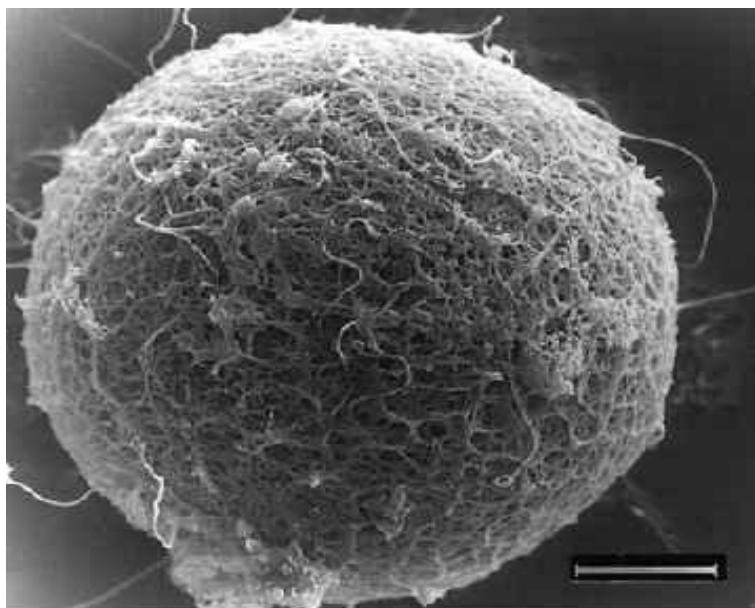
*Zona pellucida* je glykoproteinový obal vajíčka savců, který vzniká již v průběhu oogeneze a je produkován samotným vajíčkem. Jedná se o extracelulární matrix z dlouhých vláken (Jovine *et al.*, 2007). *Zona pellucida* je složena ze tří glykoproteinů (ZP1, ZP2, ZP3). Dva z těchto glykoproteinů, ZP2 a ZP3, tvoří filamenta, která jsou propojená do trojrozměrné sítě pomocí ZP1 (Obr. 8). Vrstva glykoproteinů s označením ZP3 funguje i jako receptor, na který se naváže spermie. Po oplození nastávají molekulární, strukturní i funkční změny v ZP2 a ZP3, které zabraňují navázání dalších spermií tzv. blok polyspermie. Glykoproteinové vrstvy ZP2 a ZP3 se po prodělaných změnách označují jako ZP2f a ZP3f. Proces navázání spermie na ZP je zahájen akrozómalní reakcí, při níž dochází k uvolnění hydrolytických enzymů, proteáz a hyaluronidáz z akrozómalního váčku v akrální části hlavičky spermie, které naruší povrch *zony pellucidy* (Morales *et Llanos*, 1996). Obalem vajíčka proniká tzv. akrozómalní výběžek, jehož vrchol je potažen proteinem, který se připojuje na specifické receptory umístěné na oolemě vajíčka, těsně pod plazmatickou membránou (Campbell *et Reece*, 2008). V procesu oplození oocyty má u spermie klíčovou úlohu protein *fertilin β*, který umožňuje vazbu spermie na oolemu vajíčka. Spermie při oplození nepřinášejí jen svou DNA, ale v procesu oplodnění se zapojuje celý jejich obsah, včetně mnoha nových molekul RNA. Proteiny - protaminy a histony- se naváží na chromatin spermie a podílejí se na jeho přeměně během rané fáze spermatogeneze. Předpokládá se, že tyto proteiny se účastní i procesu fertilizace a vývoje zygoty v embryu. Na kvalitě embryí se podílí i kvalita spermie. Pomocí reverzibilní transkripce a metody QR-PCR (*real-time* kvantitativní PCR) bylo porovnáváno množství *fertilinu β*, protaminu 1 (PRM1), protaminu 2 (PRM2) a hladiny koncentrace histonů (HLS1) mRNA specifických pro spermatidy. Výrazně nižší množství *fertilinu β* bylo zaznamenáno u spermií, u kterých došlo k selhání metody IVF. Naopak kvalitní embrya vznikla po oplození spermií, u které byla se zvýšená hladina koncentrace *fertilinu β*, PRM1, PRM2 a mRNA. Transkripce probíhající u zralé spermie nevznikají *de novo*, ale jsou řízeny zbytky cytoplazmy, která nebyla vyloučena během počáteční fáze spermatogeneze (Depa-Martynów *et al.*, 2007).

Po narušení glykoproteinového obalu vajíčka dochází k fúzi plazmatické membrány hlavičky spermie s plazmatickou membránou vajíčka a k vstupu jádra jediné spermie do cytoplazmy vajíčka (Morales *et Llanos*, 1996). Po splynutí membrán vajíčka a spermie dochází k otevření iontových kanálů a v plazmatické membráně vajíčka se mění

membránový potenciál, dochází k membránové depolarizaci. Tento proces probíhá pouze 1 – 3 sekundy po navázání spermie na receptor oolemy vajíčka (Campbell *et* Reece, 2008). Depolarizace plazmatické membrány je tzv. primární blok proti polyspermii. Brzy po oplození se membránový potenciál vrací na původní hodnotu a začne probíhat proces sekundárního bloku proti polyspermii tzv. kortikální reakce (Nečas *et al.*, 2000). Jedná o sérii změn ve vnější zóně, tzv. *cortexu* vaječné cytoplazmy. Po splynutí vajíčka se spermií dochází k zahájení signálního přenosu, během kterého jsou z cytoplazmatického retikula vajíčka uvolňovány vápenaté ionty do cytosolu. Uvolnění vápenatých iontů začíná v místě vstupu spermie do vajíčka a poté postupuje ve vlnách přes celé oplozené vajíčko a dochází k uvolnění tzv. druhých posílů. Vyšší koncentrace vápenatých iontů způsobuje výraznou změnu v kortikálních zrnech, které se nacházejí pod plazmatickou membránou. Postupně dochází ke splývání kortikálních zrn s plazmatickou membránou vajíčka a uvolnění enzymů, které způsobí nevratné změny v *zoně pellucidě*, a ta pak funguje jako blokáda polyspermie.

Zvýšená koncentrace vápenatých kationů zajistí také tzv. aktivaci vajíčka. Neoplozené vajíčko má velmi pomalý metabolismus, avšak chemické změny v cytosolu vajíčka po jeho oplození, způsobují během několika minut zvýšení objemu buněčného dýchání a výkonnější syntézu proteinů (Campbell *et* Reece, 2008).

Další funkcí *zony pellucidy* je ochrana embrya během transportu na místo implantace a umožňuje udržet prostorové uspořádání blastomer dělicího se embrya (Brown *et* Cheng, 1986).



Obr. 8: Trojrozměrná síť *zony pellucidy* v elektronovém mikroskopu  
(převzato: [www.utm.utoronto.ca](http://www.utm.utoronto.ca))

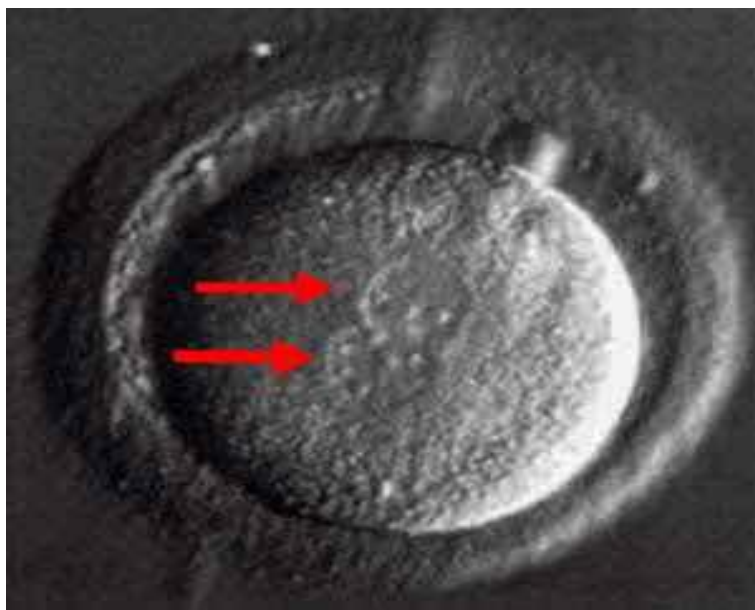
## 4.2 Vznik ženského a mužského prvojádra

Během oplození je dokončeno II. zrací dělení celého procesu oogeneze. Dojde k vytvoření mužského prvojádra a druhého pólového tělíska. Bazální tělísko spermie dává svým dělením v zygotě vznik dvěma centrozómům s centrioly. Ty vytvoří mitotické dělicí vřeténko, aby mohlo dojít k dalšímu dělení. Tuto fázi nazýváme stádium prvojader, oplozené vajíčko se označuje jako zygota, ve které jsou patrná dvě prvojádra (Obr. 9) (Campbell *et* Reece, 2008).

Jakákoliv dysfunkce centrozómu spermie je příčinou neúspěšného zakončení procesu oplození vajíčka (Nakamura *et al.*, 2001). Po oplození klasickou metodou IVF lze prvojádra sledovat asi 6 hodin po oplození (Wiker *et al.*, 1990), po ICSI jsou patrná dříve, již asi 5 hodin po oplození vajíčka. Ženská a mužská prvojádra vznikají obvykle současně, ale byly zaznamenány i případy, kdy se ženské jádro vytvořilo se zpožděním až 30 minut (Payne *et al.*, 1997).

Mužské prvojádro vzniká v blízkosti místa vstupu spermie do vajíčka, ženské prvojádro lze pozorovat v pólu ooplazmy s dělicím vřeténkem. Zpočátku jsou obě prvojádra oddělená, později společně migrují do centra buňky a asi po 15 hodinách od oplození se prvojádra nacházejí těsně u sebe, někdy dochází až k jejich překrývání. Transmisní elektronovou mikroskopií (TEM) bylo prokázáno, že prvojádra zůstávají oddělena úzkým pruhem ooplazmy, která může být bez organel, nebo se v ní nacházejí mitochondrie či hladké endoplazmatické retikulum. U ženského

prvojádra dochází obvykle k rozpadu obalu prvojádra dříve. Zhruba 12 hodin po splynutí vajíčka se spermií dochází uvnitř prvojader k syntéze DNA. Dojde-li během syntézy DNA k chybě, může se vývoj zygoty zastavit ve fázi prvojader, protože pro rozpad pronukleární membrány je v zygotě nezbytný signál o replikaci DNA. Obě prvojádra se začínají ztrácet asi 20 hodin po oplození. Zygota se stává jednobuněčnou a nastupuje první mitotické buněčné dělení (Veeck, 1999).



Obr. 9: Šípkami označené ženské a mužské prvojádro  
(převzato: [www.advancedfertility.com](http://www.advancedfertility.com))

### 4.3 Vliv volných kyslíkových radikálů na proces oplození

Oxidanty jsou vysoce nestabilní molekuly, které obvykle útočí na ostatní chemické látky z jejich okolí. V lidském těle jsou obrannými mechanismy proti oxidantům enzymatické a non-enzymatické antioxidanty. Reaktivní formy oxidantů (ROS) vznikají během fyziologických oxidačních procesů v těle a jsou zapojeny v patogenezi mnoha chorob. Také v procesech reprodukce (*in vivo* i *in vitro*) mají ROS fyziologickou i patologickou roli. Dojde-li k vyčerpání kapacity antioxidantů, nastane tzv. oxidační stres (OS), který může způsobovat poškození oocytů, spermií i embryí. Tyto děje ohrožují i správný průběh IVF (Agarwal *et* Allamaneni, 2004). Nízká hladina ROS v pohlavním ústrojí mužů je nezbytná pro správnou funkci spermií, jako je kapacitace, akrozómální reakce a splynutí spermie s oocitem. OS může způsobit lipoperoxidaci membrán spermie, jež vede k poškození DNA a navození apoptózy (Fingerová *et al.*, 2009).

Spermie jsou velmi citlivé na oxidační poškození, jelikož je u nich nedostatek enzymatických antioxidantů, které by účinně zabránily oxidačním vlivům ROS. Příroda tento nedostatek vykompenzovala tím, že mnoho antioxidantů se nachází v seminální plazmě. ROS mohou ovlivnit počet a kvalitu spermií, nebo mohou narušit průběh fúze oocytu se spermií. Dále může dojít k poškození DNA u spermie a tím i k narušení správného vývoje embrya. U žen mohou ROS poškodit zrání oocytů, narušit proces ovulace, znemožnit oplození vajíčka nebo poškodit endometrium, čímž znemožní nidaci embrya. Mnoho antioxidantů obsahuje folikulární tekutina. Jsou-li ROS přítomny ve vyšší koncentraci i ve folikulární tekutině, mohou výrazně snížit úspěšnost IVF (Agarwal *et* Allamaneni, 2004).

## 5 Vybrané metody asistované reprodukce

Asistovaná reprodukce je mladý podobor medicíny, který pracuje s genetickým materiálem člověka (spermií, vajíčkem, embryem nebo jeho částmi) mimo tělo člověka *in vitro*. Hlavním úkolem je dosáhnout oplodnění ženy (Kääriäinen, 2006).

### 5.1 Transfer gamet nebo zygot do vejcovodů

Prvními metodami, které se využívaly k početí, byl přenos genetického materiálu do vejcovodů ženy. Genetickým materiálem mohou být gamety (v případě metody transferu gamet do nitra vejcovodů GIFT - *gamete intra-fallopian transfer*) nebo zygoty (v případě transferu zygot do nitra vejcovodů ZIFT - *zygote intra-fallopian transfer*) (Kääriäinen, 2006).

Výhody metody GIFT byly četné - jediná laparoskopie, přirozené prostředí oplození ve vejcovodu, předcházelo se možnému vyvolání traumatu děložní sliznice při transferu embrya. Tuto metodu nebylo možné použít u pacientek se silnými srůsty v oblasti pánevního dna, při neprůchodnosti vejcovodů nebo v případě velmi snížené mužské plodnosti (Wang *et Sauer*, 2006). Světová asociace zabývající se metodami asistované reprodukce uvádí, že metoda GIFT je dnes užívána pouze u 6 % případů a metoda ZIFT pouze u 2 % případů (Wang *et Sauer*, 2006).

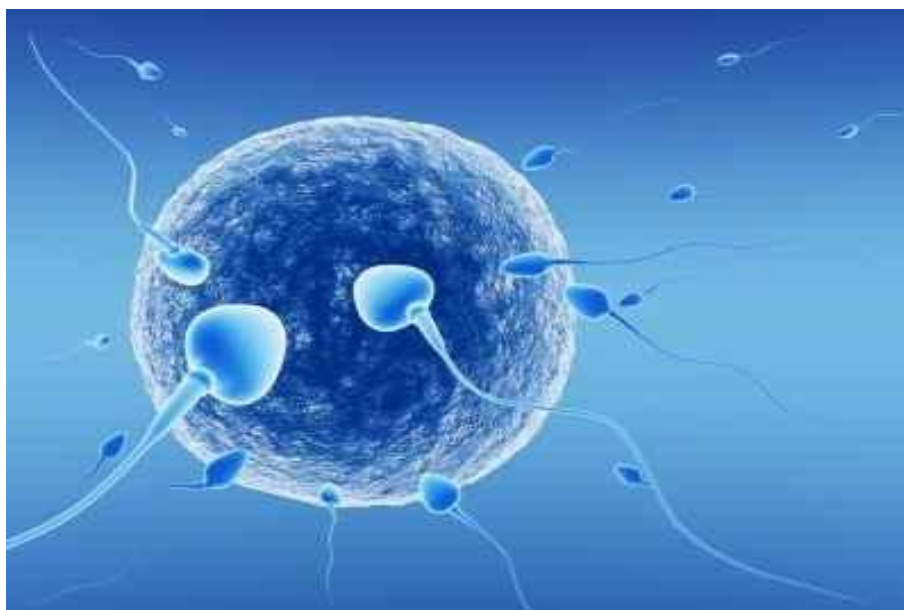
### 5.2 *In vitro* fertilizace – klasická metoda

Neplodnost je celosvětovým problémem. Asistovaná reprodukce, jejíž součástí je *in vitro* fertilizace (IVF), přenos embrya/í do dělohy (embryotransfer) a další metody zvyšují možnost narození dítěte párům s poruchou plodnosti. Předpokládá se, že ve světě se v současné době narodilo více než 2 miliony dětí pomocí metod IVF. Metody asistované reprodukce (ART) však nemohou být využívány v širokém měřítku, hlavně z důvodu finanční náročnosti. V mnoha bohatých zemích světa je zdravotními pojišťovnami hrazen jen omezený počet cyklů IVF a ET (Hovatta *et Cooke*, 2006), V České republice hradí zdravotní pojišťovny ženám ve věku od 18 do 39 let tři léčebné cykly za život ([www.novinky.cz](http://www.novinky.cz)).

Metoda byla ve světě poprvé použita v 70. letech 20. století z důvodu neprůchodnosti vejcovodů u pacientky. Celý zákrok vedli lékaři Patrick Steptoe a Robert Edwards. Problém neprůchodnosti vejcovodů byl nově vzniklou metodou úspěšně vyřešen a 25. června 1978 se narodilo první dítě počaté pomocí IVF – Louis Brown. Od tohoto okamžiku došlo k rozšíření metody do celého světa. Proces *in vitro* fertilizace se stále

zdokonaluje a umožňuje úspěšné oplodnění i při jiných příčinách poruch plodnosti - srůsty děložní sliznice, andrologický faktor nebo nevysvětlitelná příčina neplodnosti (Edwards, 1978). Robert Edwards obdržel v roce 2010 za rozvoj IVF a svůj přínos v oboru asistované reprodukční medicíny Nobelovu cenu (převzato: <http://nobelprize.org>).

Při klasickém IVF jsou spermie promytím zbaveny seminální plasmy a v koncentraci 50 – 1 000 000 spermií/ml jsou poté přidány k oocytu (Obr. 10). Vyšší koncentrace spermií negativně ovlivňuje kvalitu kultivačního prostředí, jelikož zde dochází ke vzniku volných kyslíkových radikálů nebo jiných metabolitů (Aitken, 1994). Oocyty jsou se spermii během klasického IVF kultivovány asi 17 – 20 hodin, jelikož po uplynutí této doby lze pozorovat při úspěšném oplodnění oocytu vznik prvojader (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990, Zaneveld *et al.*, 1991, Březinová *et al.*, 2001).



Obr. 10: Vajíčko s několika tisíci spermii - oplození (převzato: topnews.ae)

## 5.3 Mikromanipulační techniky

Jedná se o laboratorní techniky, jež jsou vysoce odborně a technicky náročné. Provádějí se s využitím mikromanipulačního zařízení, kdy pomocí speciálních skleněných mikropipet je pracováno s jednotlivými vajíčky, spermii nebo embryi pod mikroskopem (Schlegel *et* Girardi, 1997).

### 5.3.1 Intracytoplazmatická spermatická injekce

Metoda intracytoplazmatické spermatické injekce (ICSI) je používána ve stále větším měřítku, zejména v případech snížené mužské plodnosti (Pinheiro *et al.*, 1999). Úspěšnost oplození metodou ICSI je závislé na životaschopnosti spermii, kvalitě oocyty a jeho efektivní aktivace nebo schopnosti oocyty akceptovat intracytoplazmatickou injekci. Kromě andrologického faktoru neplodnosti je tato metoda vhodná i pro páry, u kterých v předchozích cyklech IVF nedošlo klasickou metodou k oplodnění vajíčka nebo při imunologickém faktoru neplodnosti. Základní indikací k využití metody ICSI je snížení koncentrace spermii pod hranici  $2 \times 10^6$  v 1 ml ejakulátu, snížená pohyblivost spermii pod 5 % nebo patologická morfologie spermii (Schlegel *et* Girardi, 1997).

Nalezené oocyty s komplexem kumulárních buněk jsou nejprve očištěny pomocí enzymu hyaluronidázy a je posouzen stupeň jejich zralosti (Palermo *et al.*, 1999). ICSI se vždy provádí ve stádiu druhé metafáze oocyty, která je charakteristická tím, že chromozómy jsou uspořádány v ekvatoriální rovině nedaleko pólového tělíska. Mechanické poškození uspořádání chromozómů v ekvatoriální rovině může být způsobeno mikropipetou při vpichu nebo přítomností pohyblivých spermii v cytoplazmě oocyty.

Při vpichu spermie jsou oocyty stabilizovány pomocí speciální mikropipety a jedna vybraná spermie je po imobilizaci nasáta do mikropipety a přes *zonu pellucidu* a *oolemmu* umístěna do cytoplasmy oocyty (Obr. 11) (Schlegel *et* Girardi, 1997).

Po 12 – 17 hodinách od aplikace spermie jsou oocyty kontrolovány, zda došlo k oplození podle přítomnosti dvou prvojader (pronukleí) a dvou pólových tělísek v perivitellinním prostoru. Vyhodnocení prvního rozrýchování je možné po dalších 20 - 24 hodinách (Palermo *et al.*, 1999).





Obr. 11: ICSI – průnik mikropipety skrz *zonu pellucidu a oolemmu*  
(převzato: [www.californiaivf.com](http://www.californiaivf.com))

Při výběru vhodné spermie, která bude vpravena do oocyty pomocí mikroinjekce (ICSI) se dříve hodnotili především pohyblivost spermie a její morfologie, tedy určujícím faktorem výběru byly subjektivní pozorovací a hodnotící schopnosti embryologa (Žáková *et al.*, 2010). Jednou z nově používaných metod je i *Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection* (IMSI), která je založena na výběru morfologicky nejvhodnější spermie při zvětšení až 8000x. Hodnotícími parametry jsou počet vakuol v hlavičce a tvar hlavičky. Při tomto zvětšení je možné pozorovat i abnormality způsobené fragmentací DNA. Pro využití této metody je nezbytné, aby laboratoř měla vhodné přístrojové vybavení. Metoda patří k časově náročnějším (převzato: <http://ivf.net>). Další nově uplatňovaná metoda PICSII je založená na podobných principech výběru spermie k oplodnění oocyty jako *in vivo* v těle ženy. Spermie jsou umístěny v misce, která obsahuje hyaluronový hydrogel. Hyaluronan je biopolymer, který se přirozeně vyskytuje ve všech buňkách, včetně těch, které obklopují oocyt - *cumulus oophorus* (Horsham, 2006). Vazba na hyaluronan je možná pouze u zralých spermií, protože pouze jejich hlavička nese vhodný receptor pro tuto vazbu. Tím dochází k přirozené selekci zralých spermií a zvyšuje se šance na úspěšné oplodnění oocyty metodou ICSI. Je prokázáno, že takto vybrané spermie jsou životaschopnější, mají nižší fragmentaci DNA a obsahují méně biomarkerů pro apoptózu. Během akrozomální reakce je z hlavičky spermie uvolňován mimo jiných i enzym hyaluronidáza, který narušuje strukturu *corona radiata* a tím umožní vazbu spermie na *zonu pellucidu*

(Žáková *et al.*, 2010). Zakladatelem metody PICSI je lékař z univerzity v Yale - doktor Gabor Huszár (Horsham, 2006).

## 6 Vývoj embryí

Úspěšný průběh metod asistované reprodukce je závislý na množství oocytů získaných při ovariální punkci, na počtu transferovaných embryí a jejich morfologické kvalitě, ale i na délce kultivace embryí, která trvá standardně 48 - 120 hodin (Tvrdoňová *et al.*, 2005). Zásadní otázkou, kterou se zabývá moderní embryologie, je kvalita embrya a jeho implantační potenciál (Lechniak *et al.*, 2007). V důsledku soustavného zdokonalování metod výběru oocyty a spermie pro oplození a parametrů hodnocení embryí se přenášejí kvalitnější embrya. V současné době se pro transfer do dělohy vybírají obvykle jedno až dvě embrya. Právě přenos více embryí souvisí s rizikem vzniku a vývoje vícečetného těhotenství, které je s metodami asistované reprodukce spojeno a lze ho snížit přenosem minimálního počtu vysoce kvalitních embryí, která splňují náročná morfologická i biochemická kritéria a vykazují výbornou celkovou vitalitu (Fancsovits *et al.*, 2006).

### 6.1 Cytokineze mitotického dělení

Po replikaci a oddělení jádra následuje cytokineze buňky. Jedná se o dělení cytoplazmy, které je základním znakem životaschopnosti všech buněk. Během vývoje lidského embrya lze pozorovat sérii mitotických dělení cytoplazmy, ke kterým dochází přibližně každých 12 – 18 hodin, avšak nedochází k viditelné změně velikosti embrya. K chybnému vývoji během prvního buněčného dělení dochází u méně než 5 % oplozených oocytů, u kterých došlo ke vzniku ženského a mužského prvojádra. Kontrolu nad prvním buněčným dělením po oplodnění má u většiny savců, vyjma některých hlodavců, umístění centrozómu ze spermie.

V telofázi prvního mitotického dělení jádra dochází k prodlužování cytoplazmy zygoty, která se ve střední části zužuje a následně dochází k rozdělení buňky na dvě blastomery. Obdobně probíhají i následující mitotická dělení. Odhaduje se, že velikost blastomer se během každého ze tří mitotických dělení zmenšuje o 28,5 %. Drobné odchylky ve velikosti blastomer jsou považovány za normální (Veeck, 1999). Dojde-li během prvního mitotického dělení embrya ke vzniku dvou odlišně velkých blastomer, zvyšuje se pravděpodobnost výskytu aneuploidii (Lundin *et al.*, 2001). Dělení 2 – 8 buněčného embrya je závislé hlavně na přepisu zásobní maternální RNA (Veeck, 1999).

### 6.1.1 Fragmenty v cytoplazmě

V průběhu mitotického dělení embrya se objevuje v cytoplazmě větší nebo menší počet tzv. fragmentů (Obr. 12). Jde o komponenty neobsahující DNA, které jsou vyplněny cytoplazmou a ohraničeny membránou. Dle některých autorů se u embryí vyskytují i fragmenty s jaderným obsahem (Tvrdoňová *et al.*, 2005). Je-li ve fragmentech přítomna DNA, dává se jejich existence do souvislosti s chromozomálními abnormalitami a tato embrya většinou nepokračují ve svém vývoji (Jurisicova *et al.*, 1996). Fragmenty jsou vyloučeny z povrchu fertilizovaného oocyty nebo blastomer embrya, avšak charakter jejich membrány se výrazně liší od povrchové membrány blastomer (Tvrdoňová *et al.*, 2005).

Fragmenty se v cytoplazmě mohou objevit již během prvního mitotického dělení. Malé množství fragmentů nemá negativní dopad na životaschopnost embrya, avšak vytvoří-li se jich velké množství takto brzy, dojde k narušení dalšího vývoje embrya (Veeck, 1999). Množství přítomných fragmentů vztažené na celkový objem embrya se vyjadřuje v procentech.

Vznik těchto komponent v cytoplazmě ovlivňuje oocyt i spermie. Obsahuje-li spermie před oplozením poškozenou DNA, dochází u embrya k vyšší fragmentaci (Dozortsev *et al.*, 1998). U oocytů způsobují fragmentaci hlavně metabolické poruchy. Čím vyšší stupeň fragmentace, tím nižší implantační potenciál embryo má. Vznik fragmentů může být způsoben nižším obsahem cytoplazmy, která je v buňkách embrya dostupná pro normální průběh jejich dělení. Nedostatečný objem cytoplazmy se projevuje např. snížením počtu blastomer v embryu nebo jejich různou velikostí. Zvýšená fragmentace také negativně ovlivňuje průběh procesu kompaktace, protože buňky nejsou v těsném kontaktu (Tvrdoňová *et al.*, 2005).

Je prokázáno, že vyšší stupeň fragmentace je v přímé úměře se stupněm apoptotických změn, v cytoplazmě blastomer embryí se vyskytuje více apoptotických tělísek a sraženin. Fragmentovaná embrya produkují větší množství volných kyslíkových radikálů (ROS) než embrya bez fragmentů nebo neoplozené oocyty. Vyšší hladiny ROS mohou způsobit trvalé poškození buněčné membrány nebo DNA (Jurisicova *et al.*, 1996).



Obr. 12: Fragmentace embrya (převzato: [www.osel.cz](http://www.osel.cz))

## 6.2 Průběh dělení embrya v prvních pěti dnech

Za 0. den kultivace se obvykle označuje den punkce vajíček a jejich následné fertilizace (Boiso *et al.*, 2002). Oocyty se získávají punkcí ovarií pod kontrolou ultrazvuku, které předchází ovariální stimulace. Po odstranění okolních granulózních buněk bylo zjištěno, že 15 - 20 % získaných oocytů je nezralých. Tyto oocyty ani po dozrání nejsou většinou schopny fertilizace, pokud oplození proběhne, dochází k abnormálnímu průběhu embryonálního vývoje - asynchronní vývoj, chybná cytokineze při mitotickém dělení (Chang *et al.*, 2008).

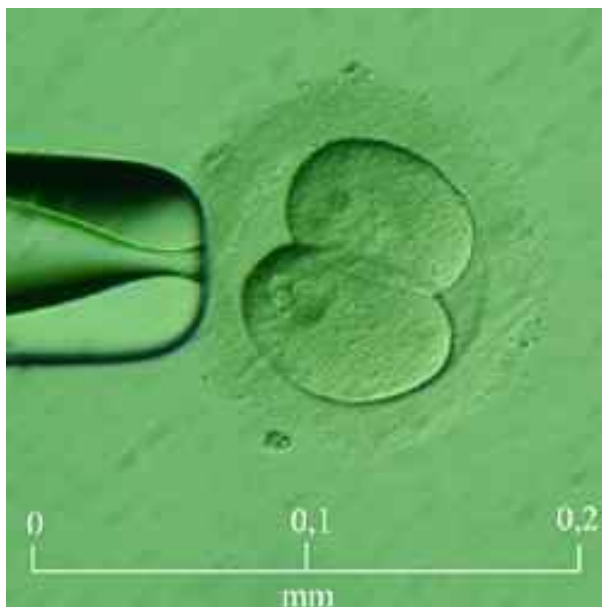
V 1. dnu kultivace po 16 – 18 hodinách lze u tzv. normálně oplozeného oocyty pozorovat stádium dvou prvojader (PN). Mužské a ženské prvojádru vzniká z chromatinu spermie a oocyty. Asi za 20 hodin se obě prvojádru ztrácejí a dochází k nástupu prvního mitotického dělení embrya (Veeck, 1999). Je-li přítomný jiný počet prvojader než 2PN, došlo u oocyty k abnormálnímu oplození. Jestliže je přítomno jedno abnormálně velké prvojádru, jedná se zpravidla o ženské prvojádru. Mužské prvojádru může být v těchto případech velmi malé, nebo není vytvořeno. Triploidní oocyt zpravidla obsahuje jedno mužské prvojádru a dvě ženská. Vzniká v důsledku abnormálního průběhu cytoplazmatických vln po oplození oocyty (Payne *et al.*, 1997). V klinické praxi využívají embryologové k posouzení tzv. normálního průběhu oplození oocyty dvě kritéria – přítomnosti dvou prvojader po 16 – 18 hodinách od inseminace a výskyt dvou pólových tělísek v perivitelinním prostoru. Avšak přítomnost druhého pólového tělíska je někdy zavádějící, protože může docházet k fragmentaci prvního pólárního tělíska (Veeck, 1999).

Za 24 - 27 hodin od inseminace, lze pozorovat dvoubuněčné embryo (Boiso *et al.*, 2002). Avšak u 1 % oocytů lze pozorovat dvoubuněčné stádium již 20 hodin po jejich oplození (Nagy *et al.*, 1994).

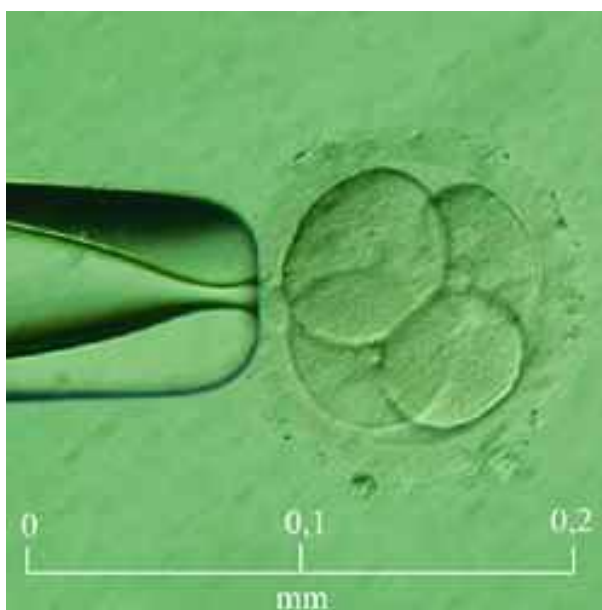
Během 2. dne kultivace se zdravé a normálně se vyvíjející dvoubuněčné embryo dělí za vzniku čtyřbuněčného embrya, tento děj je pozorovatelný asi po 39 - 60 hodinách (Obr. 13, 14). Pravidelně se dělicí embrya dosahují osmibuněčného stádia asi za 54 - 72 hodin od oplození oocytu, tedy 3. den kultivace (Obr. 15). Při kultivaci lidských embryí je možné v 3. den pozorovat i embrya, která mají 3, 5, 7 obvykle velikostně odlišných blastomer. Jedná se o důsledek časově asynchronického buněčného dělení, které může pokračovat i v následných mitotických děleních. U lidských šestnácti a vícebuněčných embryí dochází během 3. až 4. dne kultivace k procesu kompaktace, během kterého se jednotlivé blastomery začínají měnit v celistvou masu s nerozeznatelnou buněčnou membránou. Takto vzniká vývojové stádium embrya, které nápadně připomíná plod moruše (*morus*) a proto se označuje jako morula. Blastomery zde vytvářejí velmi těsná mezibuněčná spojení a plocha spoju mezi blastomery vzrůstá, což je nezbytné pro další vývoj embrya (Boiso *et al.*, 2002).

V morule vzniká migrací vnitřních buněk tekutinou vyplněná středová dutina blastocoel, vytváří se dutý kulovitý útvar, který se označuje blastula (blastocysta). Nejčastěji se stádium blastocysty objevuje během 5. dne kultivace. Časná blastocysta je složena z vnitřní masy buněk, která je obklopena zevní vrstvou zploštělých buněk (Campbell *et al.*, 2008). Vnitřní masa buněk (*inner cell mass*, ICM) je základem pro vznik embrya, vnější vrstva zploštělých buněk se postupně mění v trofoblast a placentu. Později dochází k hromadění tekutiny v blastocoele, čímž se blastocysta zvětšuje, *zona pellucida* se napíná a ztenčuje (Obr. 16). Tento expandovaný stav může přetrvávat až 24 hodin a poté následuje děj, který se označuje jako *hatching* neboli uvolnění embrya ze *zony pellucidy* (Boiso *et al.*, 2002). Embryonální hmota se zvětšuje a tlačí na *zonu pellucidu*. Přirozenému uvolnění embrya napomáhají enzymy proteázy, které produkuje samotné embryo, ale i sliznice dělohy. Implantace začíná vzájemnou komunikací odhalených buněk throphoektodermu s buňkami endometria (Hammadeh *et al.*, 2011). Jestliže k procesu *hatchingu* nedojde, neproběhne implantace a nemůže dojít ke vzniku těhotenství. Možnými příčinami proč nedojde k uvolnění embrya z glykoproteinového obalu, jsou tlustší *zona pellucida*, zvýšená hladina FSH nebo pokročilý věk ženy (Montag *et al.*, 1999).

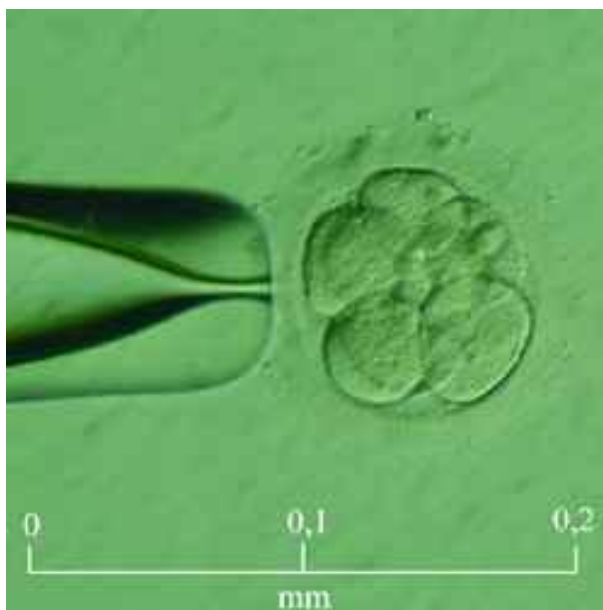
U některých embryí dochází ke zpomalení nástupu procesů dělení, jejichž příčinou může být nižší potenciál životaschopnosti embrya. Gravidita může výjimečně vzniknout i z těchto pomalu se dělících embryí, která mají po 96 hodinách kultivace pouhých 6 - 8 blastomer (Veeck, 1999).



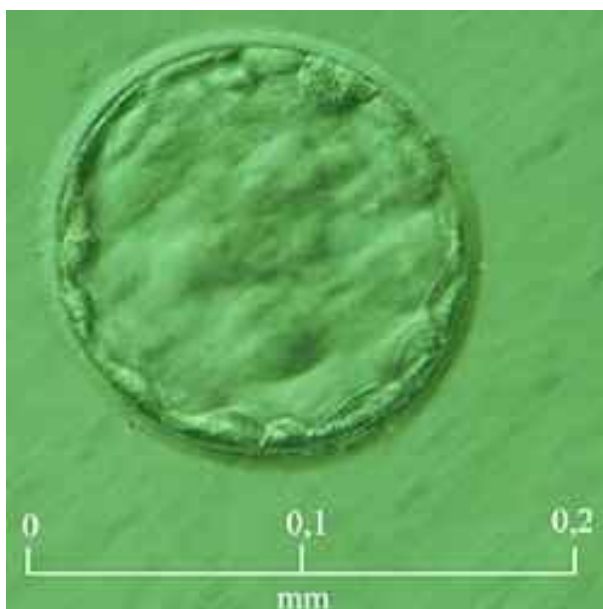
Obr. 13: Dvoubuněčné embryo – 36 hodin po oplození  
(převzato: [www.gest.cz](http://www.gest.cz))



Obr. 14: Čtyřbuněčné embryo – 48 hodin po oplození  
(převzato: [www.gest.cz](http://www.gest.cz))



Obr. 15: Osmibuněčné embryo – 72 hodin po oplození  
(převzato: [www.gest.cz](http://www.gest.cz))



Obr. 16: Expandovaná blastocysta – 120 hodin po oplození  
(převzato: [www.gest.cz](http://www.gest.cz))



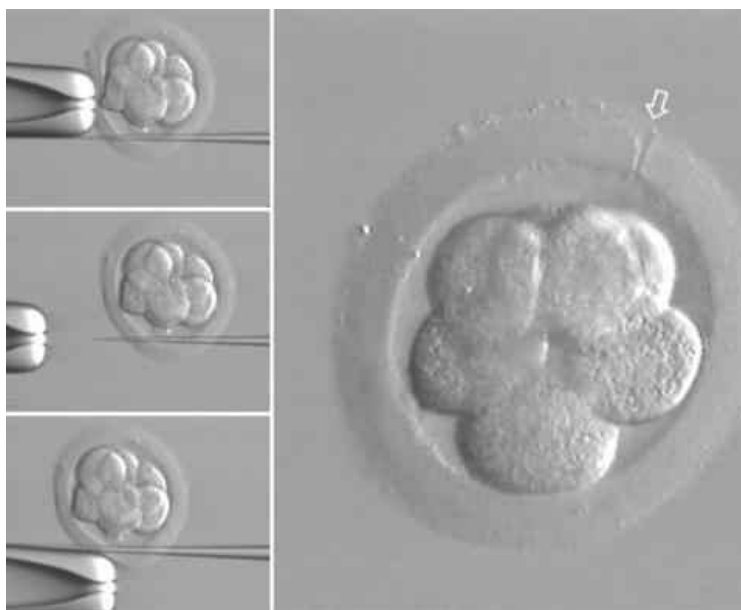
### 6.3 Asistovaný *hatching*

Úspěšnost implantace embryí, která pocházejí z IVF je okolo 20 %. Důvodem může být nižší kvalita embryí, zhoršená nebo posunutá receptivita endometria nebo kombinace obou těchto faktorů. Lidská embrya vzniklá z oocytů při superovulaci, se v podmínkách *in vitro* často vyvíjejí pomaleji než *in vivo*. Důvodem mohou být různé cytogenetické abnormality či vysoký stupeň fragmentace, pouze malé množství embryí dosáhne stádia blastocysty. Lidské embryo je obklopeno vnější glykoproteinovou *zonou pellucidou*, která po oplození oocytu udržuje celistvost dělicích se buněk, usnadňuje pohyb embrya z vejcovodu do dělohy a chrání embryo před mikroorganismy nebo buňkami imunitního systému. Embryo se ze *zóny pellucidy* uvolňuje ve stádiu blastocysty a následuje jeho implantace do endometria (Seif *et al.*, 2006).

Schopnost embrya implantovat je dána mnoha významnými faktory, například kvalita gamet, správné DNA vybavení nebo složení cytoplazmy. Avšak ani transfer embryí, která mají všechny předpoklady pro zdárný průběh implantace, nemusí vést ke graviditě, jestliže nedojde k jejich správnému uvolnění ze *zóny pellucidy*. Některá pracoviště AR proto začala využívat metody umělého narušení *zóny pellucidy* neboli asistovaný *hatching* (AH). Technika AH má mnoho variabilních provedení - mechanicky, s využitím vhodných chemických látek nebo laserem, během kterého může dojít k vytvoření malého otvoru. Těmito procesy může být *zona pellucida* ztenčena či úplně odstraněna (Hammadeh *et al.*, 2011).

#### 6.3.1 Mechanické narušení *zóny pellucidy*

Tato technika byla inspirována přirozeným narušením ZP zvětšujícím se objemem blastocysty (Hammadeh *et al.*, 2011). Během celého procesu je embryo jemně přichyceno k držící mikropipetě a druhá mikropipeta pro *hatching* se zavádí skrz *zonu pellucidu* v místě největšího perivitellinního prostoru (Obr. 17). Následně je embryo uvolněno z mikropipety a třením obou mikropipet o sebe se jemně rozrušuje povrch *zóny pellucidy*. Poté se otočí embryem tak, aby se štěrbina dostala do polohy 12 (hodin). Celý proces se znovu opakuje, avšak do kříže (Balaban *et al.*, 2002). Metoda je náročná na čas a hlavně na zručnost i zkušenosti embryologa, byla využívána hlavně v počátcích AH (Montag *et van der Ven*, 1999).



Obr. 17: Šipkou je označeno místo vpichu mikropipety při mechanickém narušení ZP (převzato: [www.sci.muni.cz](http://www.sci.muni.cz))

### 6.3.2 Narušení zony *pellucidy* pomocí Tyrodova roztoku

Tato metoda je svým technickým provedením obdobná mechanickému narušení ZP. Statická mikropipeta drží embryo a druhá mikropipeta, jež obsahuje kyselý Tyrodův roztok je opatrně přiložena k ZP, v místě dotyku vzniká narušení ZP (Balaban *et al.*, 2002). Mikropipeta obsahující kyselý roztok je přikládána v oblasti perivitelinního prostoru nebo v oblasti výskytu mimobuněčných fragmentů, aby nedošlo k přímému kontaktu kyseliny s blastomery. Proces vyžaduje rychlou a přesnou manipulaci, nesmí dojít k porušení embrya. Při kontaktu blastomer a kyseliny je nezbytné embryo opakovaně proplachovat, aby došlo k naředění a následnému úplnému odstranění kyseliny (Hammadeh *et al.*, 2011). Předmětem mnoha diskuzí je, zda kyselý Tyrodův roztok nemůže poškodit nejbližší blastomery embrya a proto se od chemické metody AH začalo ustupovat (Montag *et van der Ven*, 1999).

### 6.3.3 Narušení zony *pellucidy* laserem

Pro narušení ZP se v současné době často využívají hlavně diodové lasery. Tepelné účinky laseru jsou minimalizovány jeho speciální technickou úpravou. Laserový paprsek se používá k otevření ZP nebo k jejímu ztenčení v podobě jemného kanálku nebo brázdy, rýhy. Celý postup je využíván také při biopsii blastomer. Ve srovnání s chemickými metodami asistovaného *hatchingu* je využití laseru šetrnější a efektivnější (Horng *et al.*, 2002). Studie prokázaly nárůst klinických těhotenství po jemném narušení, ztenčení ZP

laserem v porovnání s vytvořením jednoho hlubšího otvoru v ZP (Hammadeh *et al.*, 2011). Dle tloušťky ZP lze použít laser s různou vlnovou délkou (Balaban *et al.*, 2002).

#### **6.3.4 Enzymatické odstranění nebo ztenčení zony *pellucidy***

Enzym využívaný při tomto AH je pronáza. Embryo je vloženo do roztoku, který obsahuje pronázu po dobu asi 60 sekund. Po vyjmutí z roztoku je embryo prohlédnuto embryologem pod mikroskopem, zda došlo k efektivnímu úbytku tloušťky ZP. Pokud ne, je možné proces opakovat. Dojde k výraznému ztenčení ZP bez dalšího poškození embrya (Balaban *et al.*, 2002).

### **6.4 Hodnocení kvality embryí**

Embrya určená pro ET jsou vybírána po 2 – 5 dnech kultivace. Při jejich výběru se využívá různých klasifikačních systémů. Obecnými hodnotícími parametry jsou rychlost dělení, pravidelnost blastomer a stupeň fragmentace (Březinová *et al.*, 2009).

První práce o vyšším implantačním potenciálu těchto early cleavage embryí jsou z konce 90. let minulého století (Sakkas *et al.*, 1998, Sahoukir *et al.*, 1997). Yang *et al.*, (2009) označuje rychlost nástup prvního mitotického dělení jako významný ukazatel jejich vitality.

Původně byla embrya vybírána dle morfologie, tedy na základě počtu a stejné velikosti blastomer nebo přítomnosti fragmentace a jejího stupně. Další systém klasifikace embryí doplňuje morfologii a fragmentaci o další parametr, rychlost nástupu prvního buněčného dělení. U tzv. *early cleavage* embryí proběhlo první buněčné dělení již za 22 - 28 hodin od oplození, embrya s pomalejším nástupem dělení se označují jako tzv. *non-early cleavage* (NEC) (Sakkas *et al.* 1998, Shoukir *et al.*, 1997, Březinová *et al.*, 2009). Pokud v tomto období k nástupu dělení nedojde, předpokládá se, že se jedná o embrya se sníženou životaschopností nebo chromozomální vadou (Menezo *et al.*, 1990). Faktory, které ovlivňují nástup prvního buněčného dělení, zatím nejsou přesně známy. Vývoj oplozeného oocyty velmi ovlivňují vnější podmínky, například způsob oplození oocyty, podmínky kultivace, ale také se předpokládá, že velký vliv mají i vnitřní podmínky, tj. stavba a metabolismus samotného oocyty nebo spermie. Stále více poznatků dokládá, že to, zda dojde k transformaci zygoty v embryo, je zřejmé již ve dvoubuněčném stádiu. Toto zjištění je překvapivé, protože u některých savců, včetně člověka, regulační faktory pro první tři buněčná dělení pocházejí z mateřské gamety (Lechniak *et al.*, 2007).

Z etických a humánních důvodů bylo některými odborníky navrženo, aby byl výběr vhodného embrya proveden již v rané fázi vývoje – ve stádiu prvojader. Zastánci tohoto postupu zdůrazňují, že kultivace nadbytku embryí, z nichž nejsou všechna použita k ET, je nehumánní. Ve stádiu prvojader jsou genomy pocházející od matky a otce stále fyzicky odděleny v jednotlivých pronukleích, tím je nelze považovat za vzniklé lidské individuum. Stádium prvojader vykazuje i vysokou míru přežití a schopnosti dalšího vývoje po kryokonzervaci. Hodnotícími parametry kvality oocytů ve stavu prvojádra jsou biochemické faktory pocházející z ooplasmu, které působí na oocyt během jeho zrání a transkripční aktivita vzniklých pronukleí (Tesarik *et Greco*, 1999).

Cílem mnoha studií je vytvořit nové klasifikační parametry, pomocí kterých by bylo možné vybírat embrya s největším vývojovým potenciálem (Van Montfoort *et al.*, 2004).

#### **6.4.1 Biochemická kritéria pro výběr embrya**

Výběr nejkvalitnějšího embrya může být proveden i na základě biochemických markerů, kterými jsou třeba spotřeba kyslíku nebo látkové přeměny v kultivačním médiu – absorpce pyruvátu či glukózy, produkce laktátu. Hodnocení volných kyslíkových radikálů (ROS) v kultivačním médiu je metoda účinná, avšak náročná (Wiener-Megnazi *et al.*, 2004). Mezi další biochemická kritéria patří měření aktivity některých enzymů. Bylo zjištěno, že u implantujících embryí je výrazně nižší spotřeba pyruvátu. Vykazuje-li embryo nízkou glykolytickou aktivitu, bývá jeho transferem do dělohy až 4x častější vznik těhotenství (Shoukir *et al.*, 1997).

Jedním z dalších neinvazivních biochemických kritérií, která poukazují na kvalitu embrya, je stanovení exprese lidského leukocytárního antigenu (HLA-G). Je-li potvrzena exprese rozpustného HLA-G v kultivačním médiu, zvyšuje se úspěšnost dosažení gravidity u pacientky až na 86 %, není-li zjištěna přítomnost HLA-G, dochází až z 81 % k selhání umělého oplodnění ženy (Sher *et al.*, 2004).

#### **6.4.2 Morfologické parametry pro výběr embrya**

Z důvodu omezení výskytu vícečetných těhotenství se zejména ve skandinávských zemích embryologové snaží vybírat pro přenos jen jedno embryo (elective single embryo transfer, eSET). Aby byl tzv. eSET program úspěšný, je potřeba stanovit přesná kritéria pro výběr nejkvalitnějšího embrya. Obecně jsou za klíčová kritéria při výběru nejživotaschopnějšího embrya považovány: celková morfologie embrya (počet, tvar

a velikost blastomer), rychlost dělení a vývoje, tloušťka *zona pellucida* (Salumets *et al.*, 2003), výskyt vícejaderných blastomer (Van Montfoort *et al.*, 2004).

Kvalita embryí bývá označena stupněm. Stupeň grade I představuje nejkvalitnější embrya, oproti tomu ve stupni grade IV nacházíme embrya horší kvality (Salumets *et al.*, 2001). Další možná klasifikace kvality embryí vychází ze stupně jejich fragmentace. Hodnocení 1,0 mají embrya výborné kvality, stupeň 2 se dále dělí dle procentuálního vyjádření fragmentace embrya, 2,1 pro embrya s fragmentací do 10 % a 2,2 u embryí, kde se fragmentace pohybuje mezi 10 - 20 %. Za nejméně kvalitní jsou považována embrya s označením stupně 4,0 (Zeibe *et al.*, 1997).

Častým způsobem hodnocení kvality embryí je kombinace číslíce, která vyjadřuje počet blastomer a písmena, jež představuje procento fragmentace embrya (A = 0 %, D ≥ 50 %) (Ebner *et al.*, 2003).

U pozdějších vývojových stádií při prodloužené kultivaci se hodnotí kvalita moruly nebo blastocysty. Mezi klasifikační parametry patří stav kompaktace, stupeň kavitace, tvorba ICM a organizace trofoektodermu (Alikani *et al.*, 2000).

#### **6.4.3 Kombinovaná forma hodnocení - kvalita embryí a rychlost nástupu dělení**

Při výběru nejvhodnějšího embrya se hodnotí stádium prvojader, rychlost nástupu prvního dělení (*early cleavage*) embrya, morfologie a další vývoj 2., 3., 4. a 5. den kultivace (Yang *et al.*, 2009). Mezi dnes často využívané metody hodnocení kvality embryí, která jsou vybrána k ET patří využití *PrimoVision Systém*. Jde o neinvazivní metodu, během které probíhá kontinuální monitorování mimotělního vývoje embrya v uzavřeném inkubátoru, který je každých 15 minut snímán na 5 sekund kamerou. Následuje hodnocení kvality embryí, při kterém se klade důraz na digitální záznam, který zachycuje poruchy dělení buněk, fragmentaci, obsah vakuol a jiné patologie. Odhalení abnormalit umožňuje výběr nejvhodnějších embryí pro transfer do dělohy. Ze záznamu známe přesnou dynamiku vývoje embrya i počet buněk, které embryo mělo během jednotlivých fází vývoje při kultivaci (převzato: [www.lekari-online.cz](http://www.lekari-online.cz)).

Embrya jsou zařazena v době 44 - 46 hodin (2.den) po IVF/ ICSI do následujících kategorií:

- stupeň 1: embryo se stejně velkými 2 – 4 blastomery a bez známek fragmentace,
- stupeň 2: embryo se stejnou nebo odlišnou velikostí blastomer a s fragmentací  $\leq 10\%$  z celkového povrchu,
- stupeň 3: embryo se stejně velkými nebo odlišnými blastomery a fragmentací 11 % - 49 % z celkového povrchu,
- stupeň 4: embryo s blastomery stejně velkými nebo odlišnými blastomery a fragmentací  $\geq 50\%$  z celkového povrchu (Yang *et al.*, 2009).

Podobné je hodnocení embryí za 66 - 68 hodin kultivace (3.den):

- stupeň 1: embryo se stejně velkými 6 - 8 blastomery a bez známek fragmentace,
- stupeň 2: embryo se stejnou nebo odlišnou velikostí blastomer a s fragmentací  $\leq 20\%$  z celkového povrchu,
- stupeň 3: embryo se stejně velkými nebo odlišnými blastomery a fragmentací 21 % - 49 % z celkového povrchu,
- stupeň 4: embryo s blastomery stejně velkými nebo odlišnými blastomery a fragmentací  $\geq 50\%$  z celkového povrchu (Yang *et al.*, 2009).

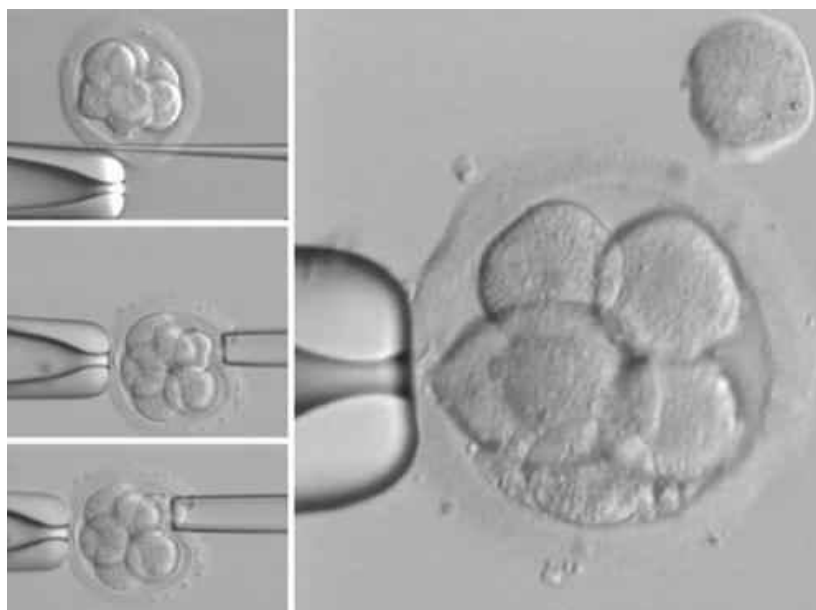
#### **6.4.4 Biopsie blastomery nebo pólového tělíska pro preimplantační genetickou diagnostiku**

Preimplantační genetická diagnostika (PDG) je invazivní metoda, pomocí které mohou být k přenosu vybrána embrya, u kterých dojde ke genetickému vyšetření pólových tělísek, 1-2 blastomer z dělicího se embrya nebo *trophectoderu* z embrya ve stádiu blastocysty (Obr. 18). Metoda vyžaduje kvalitní technické vybavení laboratoře a kvalifikované embryology a genetiky (Swanson, 2007).

První úspěch PDG byl zaznamenán v roce 1989, kdy u embrya byla zjištěna genetická porucha. Vyšetření chromozomální výbavy embrya se provádí pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo fluorescenční hybridizací *in situ* (FISH).

Nejčastěji jsou blastomery podrobeny testování metodou FISH pro vyšetření aneuploidií chromozomů X, Y, 13, 15, 16, 17, 21 a 22 (Joris *et al.*, 2005). Ve spolupráci s genetickým inženýry mohou být zjišťována monogenní onemocnění, např. Marfanův syndrom, balancovaná translokace chromozómů, např. Robertsonova translokace nebo reciproká translokace, některá recesivní nebo dominantní monogenním onemocnění vázaná na pohlaví nebo balancované chromozomální změny spojené s vyšší pravděpodobností potratu, narozením dítěte s fenotypovými abnormalitami nebo předčasným úmrtí narozeného jedince. Údaje, které vycházejí ze závěrů preimplantačního vyšetření embryí ukazují, že asi jen jedno ze čtyř embryí je schopné implantace (Gianaroli, 2000).

Preimplantační diagnostika umožňuje předejít narození plodů s vážnými geneticky podmíněnými onemocněními, na druhou stranu s sebou přináší četné etické a náboženské otázky. Relativně krátká historie preimplantační diagnostiky je doprovázena významnými kontroverzními a odporujícími si postoji (Dickens, 2005). Alternativním řešením zjištěného problému je použití vhodného dárce gamet, adopce nebo zůstat bezdětnými (nepublikováno).



Obr. 18: Průběh odběru blastomer k PDG (převzato: [www.sci.muni.cz](http://www.sci.muni.cz))

#### 6.4.5 Délka kultivace a její vliv

Mezi odborníky je také často diskutována otázka délky kultivace. V řadě pracovišť jsou přenášena embrya ve stádiu blastocysty, u kterého je předpokládána vyšší životaschopnost. Přesto embryo ve fázi blastocysty nemusí být při implantaci úspěšnější než přenesené embryo v ranější fázi vývoje (Van Montfoort *et al.*, 2004).

Počet embryí, která dosáhnou během kultivace vývojového stádia blastocysty, je v porovnání s počtem oplozených oocytů výrazně nižší. Otázkou je, jak dalece se na tomto faktu podílí embryo samotné, nebo jak je vývoj embryí *in vitro* ovlivněn podmínkami kultivace (typ použitých kultivačních médií, změny teploty, pH médií při opakovaných kontrolách, vliv světla z mikroskopů, čistota kultivačních plynů atd.) Z těchto důvodů jsou podmínky *in vitro* fertilizace stále zdokonalovány.

Avšak transfer embrya v rané fázi buněčného dělení (PN stádium, 2 – 4 blastomery), nedává embryologovi čas na posouzení jeho životaschopnosti. I embryo, které se vyvíjí v podmínkách *in vivo*, vstupuje do dělohy zpravidla 3. - 4. den od oplození. Přenos embrya s časným nástupem dělení v podmínkách *in vitro* může *in vivo* ohrozit jeho vývojový potenciál. Z tohoto důvodu je vhodné sledovat celkový průběh vývoje embrya a k jeho transferu přistoupit až v době, kdy je implantace do děložní sliznice pro embryo přirozená. Jestliže je embryo k transferu do dělohy připraveno později než v *in vivo* podmínkách, je nutné zabezpečit, aby jeho vývoj probíhal v optimálním prostředí (Conaghan *et al.*, 1998).

K transferu embrya se dříve přistupovalo už po 2. dni kultivace, jelikož kvalita kultivačních médií nemohla embryu poskytnout tak dokonalé podmínky k vývoji jako prostředí dělohy. Se zdokonalujícím se složením kultivačních médií se prodlužovala i doba kultivace embryí *in vitro* až na 6 dnů. V podmínkách *in vivo* vstupuje embryo do dělohy ve stádiu moruly, proto se mnohé studie zabývají správným načasováním ET, aby se umělé oplodnění co nejvíce přiblížilo přirozenému početí a vedlo k těhotenství. Některé studie porovnávají úspěšnost transferu 2. versus 3. den, avšak výsledky nasbíraných dat jsou rozporuplné, stejně tomu bylo při hodnocení úspěšnosti PR/ET u transferu embrya 4. nebo 5. den kultivace. Dle rozsáhlých studií zaměřených na délku kultivace a její vliv na úspěšné zakončení cyklu těhotenstvím vyplývá, že v porovnání přenosu embryí s rychlým nástupem dělení v 2. nebo 3. den kultivace jsou v PR/ET úspěšnější dvoudenní embrya. Jejich zvýšená úspěšnost je přičítána přirozenému prostředí dělohy, do kterého se embryo dostane o den dříve. Jako nejvhodnější den k ET byl na základě mnoha výzkumů doporučen 4. den kultivace, kdy dochází k aktivaci genomu



a největšímu rozvoji embrya, v tento den embryo také vykazuje největší implantační aktivitu. Během 5. dne kultivace je možné v podmínkách vyloučit ta embrya, u kterých nedošlo k aktivaci genomu a tím se zvyšuje šance na úspěšný ET, avšak tento den vybraná embrya jsou déle v *in vitro* podmínkách, což může snížit jejich vitalitu. Z výše uvedených informací jasně vyplývá, že úspěšnější jsou v procesu IVF ta embrya, která jsou co nejkratší dobu vystavena *in vitro* podmínkám - ET 2. den kultivace u pacientek s omezeným počtem oocytů nebo ET 4. den kultivace u pacientek, které prodělaly více neúspěšných cyklů (Sagiri *et al.*, 2009).

Jiné studie, stejně jako tato diplomová práce, se zaměřují na porovnání úspěšnosti PR/ET po 3. nebo 5. dnu kultivace. Kolibianakis *et al.* (2004) ve své studii uvádějí, že prodloužená kultivace do 5. dne výrazně nezvyšuje pravděpodobnost dosažení těhotenství pacientky. V porovnání s transferem třídenního embrya je hodnota PR/ET obdobná. Nevýhodami prodloužené kultivace jsou snížení možnosti kryokonzervace embryí a větší počet cyklů ukončeném bez ET. Kultivace do 5. dne je náročnější i na materiálové a technické vybavení a tím finančně nákladnější. Centrum asistované reprodukce LF v Olomouci a FNOL se rozhodlo přispět do vědecké diskuze, která se zabývá úspěšností cyklů s transferem embryí s pomalým nástupem dělení versus embryí s prodlouženou kultivací do 5. dne.

## 7 Cíle práce

Léčba snížené plodnosti je jedním z hlavních úkolů mnoha pracovišť, jedním z nich je i Gynekologicko-porodnická klinika LF UP a FNOL. Hlavním cílem této práce bylo vyhodnocení efektivity programu IVF/ICSI a ET při přenosu „pomalu“ se dělicích embryí v závislosti na délce kultivace.

### Dílčí cíle:

1. porovnání úspěšnosti cyklů IVF a ET po 3 a 5-ti denní kultivaci
  - porovnání počtů cyklů bez ET
  - vyhodnocení kvality přenášených embryí po 3 nebo 5ti dnech kultivace
  - vyhodnocení PR/cyklus, PR/ET a IR
2. vyhodnocení výsledků těhotenství
  - počet AB do 12. týdne a po 12. týdnu
  - počet porodů
  - výskyt VVV
3. posouzení významu prodloužené kultivace u NEC

## 8 Materiál a metody

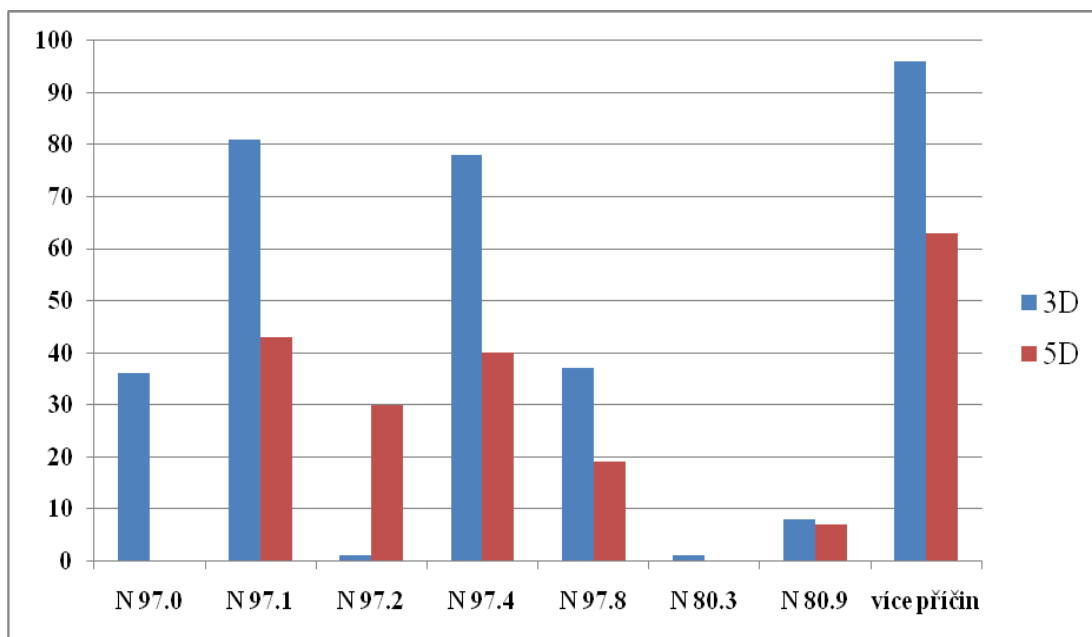
Do retrospektivní studie byly zařazeny cykly IVF/ICSI s přenosem nebo bez přenosu embryí, které proběhly v Centru asistované reprodukce Gynekologicko–porodnické kliniky LF UP a FN Olomouc od ledna 2006 do prosince 2009. Z celkového počtu 542 cyklů, u kterých byla všechna embrya klasifikována jako „pomalá“ (NEC – došlo buď pouze k rozpuštění karyolemy prvojadra, nebo byla prvojádra zachována), bylo 338 cyklů ukončeno přenosem embryí po třídení kultivací (soubor 3D) a u 204 cyklů bylo rozhodnuto o pětidení kultivací (soubor 5D). Celkem bylo do studie zařazeno 419 pacientek, u některých z nich bylo zařazeno více cyklů opakovaně tak, jak ve sledovaném období pacientky podstupovaly léčbu. Hodnocení embryí bylo prováděno pouze jedním embryologem (RNDr. Jana Březinová, Ph.D.), rozhodování o délce kultivace probíhalo po domluvě s léčeným párem.

### 8.1 Charakteristika souboru

Zastoupení jednotlivých indikací k provedení mimotělního oplození v závislosti na délce kultivace je znázorněno v grafu č. 1. Oba soubory se v indikacích k léčbě neliší, nejčastěji byla zastoupena indikace více příčin sterility, následuje tubulární faktor (N 97.1) a andrologický faktor (N 97.4). Nejméně byly zastoupeny indikace endometrióza (N 80.9) a děložní faktor (N 97.2).

Stimulace ovarií probíhala protokoly zavedenými na pracovišti CAR FNOL:

- dlouhý folikulární (depotní) protokol s GnRH-agonisty a s rekombinantním FSH
- protokol s GnRH antagonisty a rekombinantním FSH
- protokol s antiestrogeny, močovým hMG, FSH nebo rekombinantním FSH

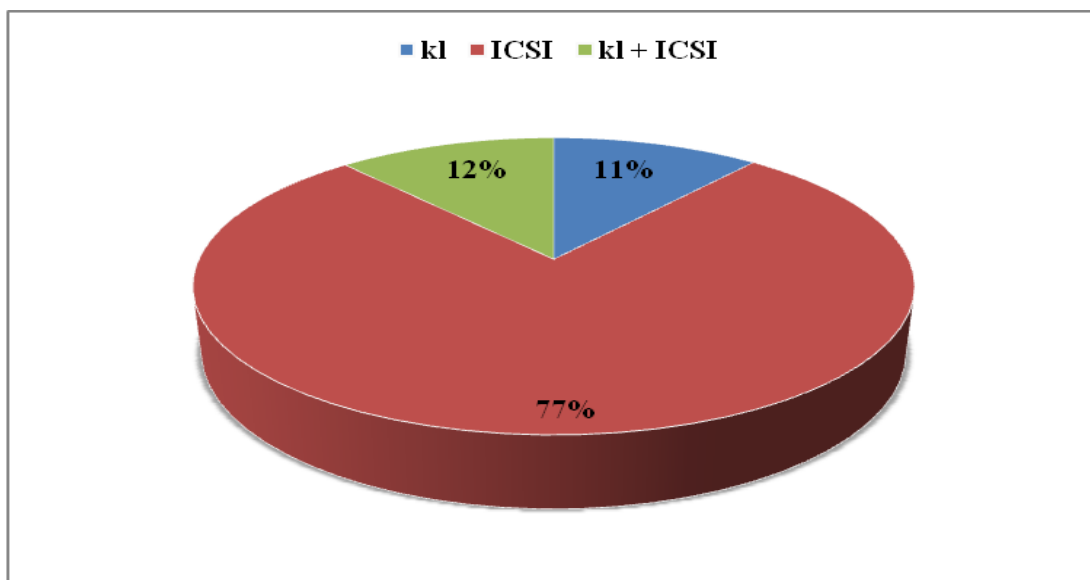


Graf č. 1: Zastoupení jednotlivých indikací k mimotělnému oplození

Legenda ke grafu:

- N 97.0 – ovariální faktor
- N 97.1 – tubulární faktor
- N 97.2 – děložní faktor
- N 97.4 – andrologický faktor
- N 97.8 – ženská neidentifikovatelná neplodnost
- N 80.3 – endometrióza pánve
- N 80.9 – endometrióza
- 3D – soubor s třídenní kultivací embrya
- 5D – soubor s pětidenní kultivací embrya

Počet léčebných cyklů dle použité metody oplození je znázorněn v grafu č. 2. Nejvíce využívanou metodou byla metoda ICSI, která je v celkovém počtu zastoupena ze 77 %. Počet cyklů, kde se k oplodnění vajíčka využívalo kombinace metod klasického IVF a ICSI, tvoří 12 % z celého souboru, metoda klasického IVF byla využita u 11 % případů.



Graf č. 2: Zastoupení použitých metod ART v souboru

## 8.2 Postup hodnocení souboru

Monitorování cyklu začalo od 8. dne stimulace transvaginální ultrasonografií. Jestliže dva nebo více folikulů dosáhlo velikosti  $\geq 20$  mm, byl k indukci ovulace do svalu aplikován lidský choriogonadotropní hormon (hCG) v dávce 5 000 nebo 10 000 IU. Odběr folikulární tekutiny byl prováděn za 34 – 36 hod. po aplikaci hCG transvaginální punkcí pod sonografickou kontrolou v celkové anestezii. Oplozování metodou klasického IVF, ICSI nebo kombinací obou metod probíhalo za 3 – 6 hod. po nalezení oocytů (graf č. 2).

K oplození metodou ICSI byly použity pouze oocyty v metafázi II. zráního dělení (MII), zatímco při klasickém IVF byly oplozovány všechny nalezené oocyty. Oocyty a embrya byly kultivovány v kultivačních médiích (Vitrolife, Sweden) ve čtyřjamkových miskách nebo v kapkách vždy pod olejem (Liquid Parafine, Origio - Medicult, Denmark). Přítomnost dvou prvojader (2PN), tedy jasná známka oplození, byla hodnocena za 16 - 20 hodin po inseminaci/ICSI. Abnormálně oplozené oocyty (1PN, 3PN) nebo normálně oplozené oocyty, které byly ve stádiu PN zamraženy, nebyly do dalšího hodnocení zahrnuty.

Kontrola nástupu prvního buněčného dělení probíhala za 22 – 25 hodin od inseminace/ICSI a pokud embrya zůstávala ve stádiu prvojader (PN), nebo u nich došlo pouze k rozpuštění karyolemy prvojader (BDPN), byla klasifikována jako **no early cleavage** (NEC) **embrya** a cykly s těmito embryi byly zařazeny do hodnocených souborů.

V souboru 3D byl transfer u všech cyklů proveden po tří denní kultivaci ve stádiu 2 - 10 blastomer a s fragmentací maximálně do 50 %.

V souboru 5D byla embrya kultivována 5 dnů a pokud nedošlo ani v tento den ke kompaktaci, nebo byla prokázána zástava dělení nebo lýza blastomer, bylo rozhodnuto o ukončení cyklu bez přenosu embryí. V případě, že pátý den kultivace bylo alespoň jedno embryo ve stádiu moruly nebo blastocysty, proběhl embryotransfer.

Biochemické těhotenství (bio pregnancy rate, bio PR) bylo určeno na základě pozitivního testu hCG 12 – 14 dnů po přenosu ( $\geq 10$  IU/l), klinické těhotenství na základě ultrazvukového určení počtu gestačních váčků s/bez přítomné akce srdeční (pregnancy rate, PR). Implantační poměr (IR) byl definován jako počet gestačních váčků s akcí srdeční na počet transferovaných embryí. Jako rané těhotenské ztráty byly hodnoceny ztráty do 12. týdne těhotenství. Výsledky těhotenství (porod, pozdní těhotenské ztráty nad 12. týden těhotenství) byly vyhodnoceny podle zprávy o porodu, kterou pacientky zasílaly na pracoviště CAR po ukončení těhotenství. Zpráva o výsledku těhotenství byla získána od všech pacientek.

V obou souborech (3D, 5D) s přenosem pouze NEC embryí byly hodnoceny a porovnávány tyto **vstupní parametry**:

- věk pacientky,
- počet nalezených oocytů,
- počet oplozených oocytů,
- procento oplozených oocytů (fertilization rate, FR),
- počet transferovaných embryí.

Jako **výstupní** byly hodnoceny tyto **parametry**:

- počet získaných biochemických těhotenství (bio PR),
- počet klinických (PR) těhotenství,
- implantační poměr (IR),
- rané těhotenské ztráty (AB),
- četnost získaných těhotenství,
- výsledky těhotenství (porod, pozdní AB),
- poměr pohlaví.

Dále byla hodnocena kvalita přenášených embryí - počet blastomer v souboru 3D, dosažené vývojové stádium v souboru 5D (morula, blastocysta).

### **8.3 Statistická hodnocení**

Statistické zpracování bylo provedeno v Centru výpočetní techniky UP a v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FNOL pomocí programů *STATISTICA* (StatSoft ČR s.r.o. (2007). *STATISTICA Cz [softwarový systém pro analýzu dat]*, verze 8.0. [www.statsoft.cz](http://www.statsoft.cz)) a SPSS v. 12.0. S ohledem na typ dat byl použit dvouvýběrový t-test, test pro porovnání dvou poměrů a  $\chi^2$  test. Při všech výpočtech byla uvažována 5 % hladina významnosti.

## 9 Výsledky

Za sledované období proběhlo v CAR FNOL celkem 542 cyklů, ve kterých byla všechna získaná embrya hodnocena jako „pomalá“ tj. *no early cleavage* (NEC). Ve 338 z nich (tj. 62,4 %) byl embryotransfer proveden třetí den kultivace, u zbylých 204 (37,6 %) bylo rozhodnuto o pětidenní kultivaci.

Oba soubory se při porovnávání vstupních parametrů statisticky významně liší pouze v počtu přenášených embryí ( $p = 0,000$ ), ostatní sledované hodnoty jsou bez statisticky významného rozdílu (Tab. 2). V souboru 5D bylo přenášeno v průměru méně embryí než v souboru 3D ( $1,8 \pm 0,5$  vs.  $2,0 \pm 0,5$ ,  $p = 0,000$ ).

Tab. 2: Porovnání sledovaných vstupních parametrů mezi soubory 3D a 5D

Parametr	3D (průměr ± SD)	5D (průměr ± SD)	Stat.sign. (p)
Počet cyklů	338	204	-
Věk pacientek	$33 \pm 4,5$	$33,4 \pm 4,2$	NS
Počet nalezených oocytů	3839	2904	-
Počet oplozených oocytů	3212	2328	-
FR (%)	74 (2378/3212)	75 (1739/2328)	NS
Počet hodnocených embryí	2378	1739	-
Průměr embryí/ET ± SD	$2 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,5$	0,000

Legenda:

hodnoty byly porovnávány t-testem

Stat. sign. – statisticky signifikantní

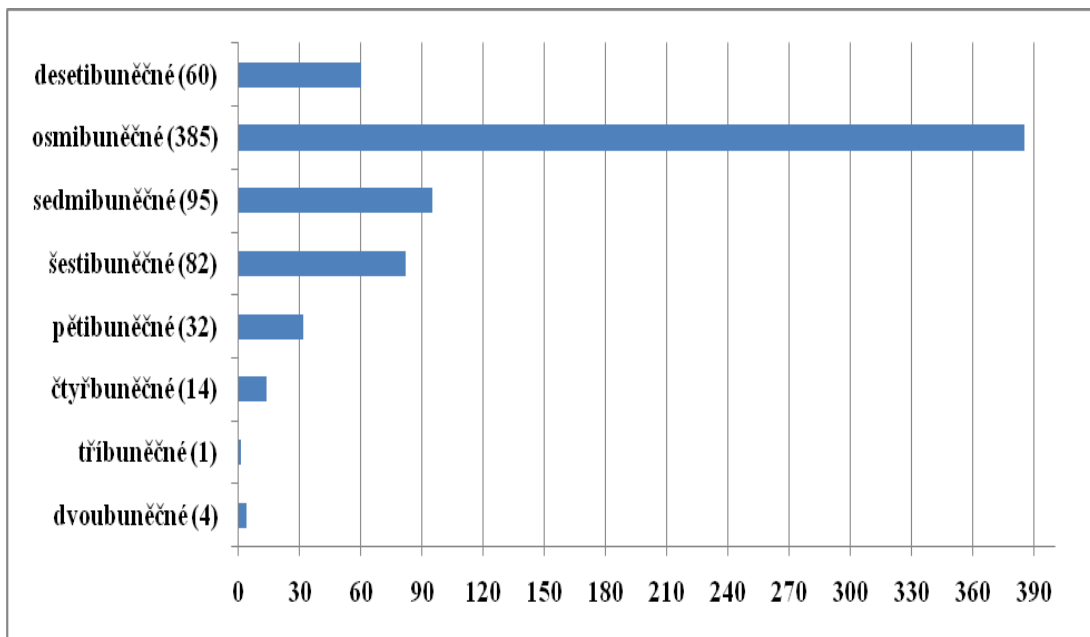
SD – směrodatná odchylka

NS – statisticky neprůkazný rozdíl,  $p > 0,05$

V souboru s třídní kultivací skončily všechny cykly přenosem embryí, zatím co při pětidenní kultivací skončilo 33 cyklů (16,2 %) bez přenosu, protože k němu nebyla vhodná embrya.

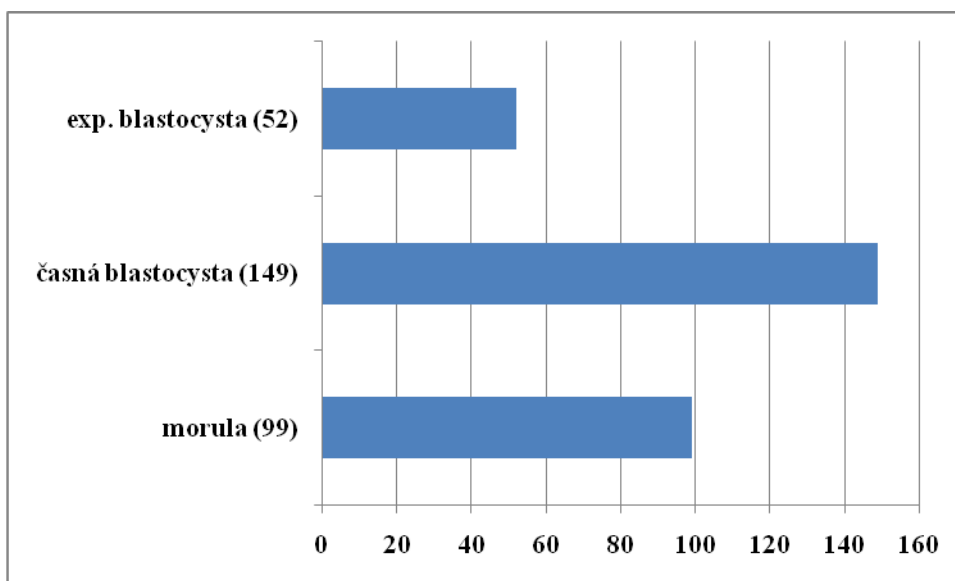
V grafu č. 3 je znázorněna kvalita třídních embryí vyjádřená počtem blastomer. V souboru 3D byla přenášena embrya ve stádiu 2 - 10 buněk, průměrný počet byl  $7,5 \pm 1,3$  blastomery.





Graf č. 3: Kvalita přenášených třídních embryí dle počtu blastomer

V souboru 5D byla přenášena embrya ve stádiu moruly, časně nebo expandované blastocysty. Kvalita přenášených pětidenních embryí je znázorněna graficky v grafu č. 4.



Graf č. 4: Kvalita přenášených pětidenních embryí dle vývojového stádia

V souboru 3D bylo dosaženo 153 biochemicky prokázaných těhotenství (PR 45 % na embryotransfer = cyklus), ultrazvukem bylo u 125 z nich potvrzeno klinické těhotenství (PR 37 % a IR 25 %). Z dosažených těhotenství bylo 67 % jednočetných a 33 % dvojčetných. V tomto souboru tvořily časně těhotenské ztráty 11 % (14 AB).

V souboru 5D bylo dosaženo 95 biochemicky prokázaných těhotenství (PR 56 % na embryotransfer), ultrazvukem bylo u 86 z nich potvrzeno klinické těhotenství (PR 50 % a IR 36 %). Z dosažených těhotenství bylo 76 % jednočetných, 23 % dvojčetných a 1 % trojčetných (1 těhotenství). V tomto souboru tvořily těhotenské ztráty 16 % (14 AB).

Při porovnání sledovaných výstupních parametrů byl mezi soubory 3D a 5D nalezen rozdíl v počtu cyklů ukončených bez přenosu ( $p = 0,000$ ). V počtu dosažených těhotenství na započatý cyklus nebyl zjištěn statisticky průkazných rozdíl. V souboru 3D byl dosažen PR/cyklus 37 % vs. 42 % souboru 5D,  $p > 0,05$ .

Při porovnávání těchto parametrů vztažených k embryotransferu byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly v PR ( $p = 0,001$ ) a IR ( $p = 0,001$ ), úspěšnější byly cykly s pětidenní kultivací. Zjištěné vyšší těhotenské ztráty v souboru 5D vzhledem k velikostem souborů nejsou statisticky průkazné (Tab. 3).

Tab. 3: Porovnání sledovaných výstupních parametrů mezi soubory 3D a 5D

Parametr	3D	5D	Stat.sign. (p)
Počet cyklů	338	204	-
Počet zrušených cyklů	0	33	0,000
Počet ET	338	171	-
Počet bio PR	153	95	-
Počet klin. PR	125	86	-
bio PR/cyklus (%)	<b>45</b> (153/338)	<b>46,5</b> (95/204)	NS
PR/cyklus (%)	<b>37</b> (125/338)	<b>42</b> (86/204)	NS
PR/ET (%)	<b>37</b> (125/338)	<b>50</b> (86/171)	0,001
IR (%)	<b>25</b> (166/673)	<b>36</b> (108/300)	0,001
AB < 12.týden	<b>11</b> (14/125)	<b>16</b> (14/86)	NS
Četnost těhotenství (%)			
jednočetné	<b>67</b> (84/125)	<b>75,6</b> (65/86)	-
dvoučetné	<b>33</b> (41/125)	<b>23,2</b> (20/86)	-
tříčetné	-	<b>1,2</b> (1/86)	-

Legenda:

NS – statisticky neprůkazný rozdíl,  $p > 0,05$

Stat. sign. – statisticky signifikantní

V souboru 3D po 12. týdnu dále probíhalo 111 těhotenství, došlo však ještě ke třem těhotenským ztrátám. Celkem bylo zaznamenáno 108 porodů, což je 86,4 % ze všech klinických těhotenství. Porozeno bylo 60 hochů a 82 děvčat (Tab. 4).

V souboru 5D po 12. týdnu pokračovalo 72 těhotenství, zaznamenali jsme však dalších šest těhotenských ztrát. Porodilo celkem 66 pacientek, což je 76,7 % z celkového počtu dosažených klinických těhotenství. Narodilo se 37 chlapců a 53 děvčat (Tab. 4).

Tab. 4: Charakteristika cyklů zakončených porodem

<b>Parametr</b>	<b>3D</b>	<b>5D</b>	<b>Stat.sign. (p)</b>
<b>Počet G po 12. týdnu</b>	111/338	72/204	-
<b>AB &gt; 12 týden</b>	3 (3/111)	8 (6/72)	NS
<b>Počet porodů na dosažené klinické těhotenství</b>	<b>86,4</b> (108/125)	<b>76,7</b> (66/86)	NS
<b>Poměr pohlaví (hoch : děvče)</b>	42 : 48	41 : 59	-
<b>Indukovaný AB z důvodu VVV</b>	0	3	-

Legenda:

statistické hodnocení bylo provedeno porovnáním dvou poměrů

NS – statisticky neprůkazný rozdíl,  $p > 0,05$

Stat. sign. – statisticky signifikantní

VVV – vrozená vývojová vada

V souboru 3D nebyla nahlášena žádná těhotenská ztráta z důvodu zjištěné VVV plodu, naopak v souboru 5D byly provedeny 3 indukované potraty pro zjištěnou VVV v rámci genetického screeningu. Porod dítěte s vrozenou vývojovou vadou nebyl zaznamenán ani v jednom souboru. V obou souborech však byla zjištěna úmrtí novorozence, v soubor 3D dvě ztráty (vždy jedno z dvojčat při předčasném porodu) a v souboru 5D jeden mrtvorozený plod u jednočetného těhotenství. Příčina úmrtí nebyla zjištěna ani při pitvě plodu.

## 10 Diskuze

Stále více studií se zabývá nalezením neinvazivních hodnotících kritérii, která by umožňovala vybrat nejkvalitnější a nejživotaschopnější embryo pro transfer do dělohy. Jednou z možností je výběr embrya na základě hodnocení doby nástupu prvního buněčného dělení, které se považuje za doplňující kritérium pro celkové hodnocení kvality embrya. Výsledky IVF a ET (PR a IR) po přenosu tzv. „rychle se dělících embryí“ byly porovnávány s výsledky cyklů s „pomalu se dělícími embryí“ a široce publikovány (Březinová, 2005, Lundin *et al.*, 2001, Salumets *et al.*, 2003). Nepodařilo se mi najít žádnou práci, která by se věnovala dalšímu vývoji embryí a výsledkům cyklů, ve kterých byla všechna embrya hodnocena jako pomalá (NEC). Jak postupovat v cyklech, jestliže jsou všechna embrya „pomalu“ se dělící, nepravidelná, fragmentovaná? Je volbou zvýšení pravděpodobnosti těhotenství prodloužení kultivace *in vitro*?

Proto jsem v této práci porovnávala a vyhodnocovala vliv délky *in vitro* kultivace embryí s pomalým nástupem dělení (NEC) na výsledky IVF a ET ne jen s ohledem na uváděné dosažené PR a IR, ale zvláště s přihlédnutím na výsledky těchto těhotenství – počet porodů, pozdních těhotenských ztrát a výskyt vrozených vývojových vad.

Cílem mé práce tedy bylo přispět do diskuze na téma rychlosti dělení embryí a délky kultivace v procesu IVF a ET.

### 10.1 Vstupní parametry

V této práci jsem se zabývala úspěšností IVF a ET po přenosu embryí s pomalým nástupem dělení (NEC). Byly hodnoceny a porovnávány vstupní parametry, které mohou ovlivnit úspěšnost jednotlivých cyklů. V Centru asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky LF a FNOL se provádí asi 300 léčebných cyklů za rok, což ovlivnilo velikost hodnoceného souboru, stejně jako podmínka, že embryologickou část těchto cyklů, prováděl jediný embryolog (vedoucí mé práce RNDr. Jana Březinová, Ph.D).

Výsledky a výstupy práce může ovlivnit velikost a homogenita sledovaného souboru, kritéria pro zařazení cyklu atd. Dalším ze základních parametrů je **věk pacientky**, který se může podílet na rychlosti nástupu prvního buněčného dělení embrya. Je známo, že s rostoucím věkem pacientky klesá životaschopnost a kvalita během ovulace uvolněných oocytů, snižuje se úspěšnost oplození, kvalita embrya i jeho implantace v děloze. Přestože pacientky s pětidenní kultivací byly v průměru o půl roku starší, není tento rozdíl statisticky průkazný. Podobné a stejně neprůkazné rozdíly ve věku pacientek

uvádí i práce Coskun *et al.* (2000), Kolibianakis *et al.* (2004) a Beesley *et al.* (2009), které hodnotí vliv délky kultivace na úspěšnost metod asistované reprodukce (Tab. 5).

Tab. 5: Hodnoty některých vstupních parametrů z různých literárních zdrojů

Zdroj	Počet cyklů 3D	Počet cyklů 5D	Věk 3D	Věk 5D	Stat. sign. (p)
<b>Coskun <i>et al.</i>, 2000</b>	101	100	30,7 ± 5,4	30,4 ± 4,9	NS
<b>Kolibianakis <i>et al.</i>, 2004</b>	234	266	31,3 ± 0,3	31,5 ± 0,2	NS
<b>Beesley <i>et al.</i>, 2009</b>	153	121	33,3 ± 2,9	31,8 ± 3,9	NS
<b>CAR FNOL 2011</b>	<b>338</b>	<b>204</b>	<b>33,0 ± 4,5</b>	<b>33,4 ± 4,2</b>	<b>NS</b>

Legenda:

NS – statisticky neprůkazný rozdíl,  $p > 0,05$

Stat. sign. – statisticky signifikantní

3D – soubor s 3. denní kultivací

5D - soubor s 5. denní kultivací

Počet nalezených a oplozených oocytů nebo počet dále se dělicích embryí také ovlivňují úspěšnost cyklu. Procentuálně vyjadřuje počet oplozených oocytů - *fertilization rate* (FR). I při porovnání tohoto vstupního parametru (Tab. 6) nebyl nalezen průkazný rozdíl mezi soubory 3D a 5D zejména protože u většiny cyklů byla použita ICSI metoda oplození. Podobně nevýznamné jsou rozdíly i v publikovaných souborech Kolibianakis *et al.* (2004), Coskun *et al.* (2000).

Tab. 6: Procentuálně vyjádřený počet oplozených oocytů z různých literárních zdrojů

Zdroj	FR (%) 3D	FR (%) 5D	Stat. sign. (p)
<b>Coskun <i>et al.</i>, 2000</b>	68	67	NS
<b>Kolibianakis <i>et al.</i>, 2004</b>	61,3	63,4	NS
<b>CAR FNOL 2011</b>	<b>74</b>	<b>75</b>	<b>NS</b>

Legenda:

NS – statisticky neprůkazný rozdíl,  $p > 0,05$

Stat. sign. – statisticky signifikantní

3D – soubor s 3. denní kultivací

5D - soubor s 5. denní kultivací

Proces implantace embrya je velmi ovlivňován i **rychlostí nástupu prvního buněčného dělení**. Již v pilotních pracích o vlivu rychlosti nástupu prvního buněčného dělení embrya, Shoukir *et al.* (1997), prokázali zvýšení PR při přenosu EC embryí v porovnání s NEC embryí (33 % vs. 15 % po klasickém IVF, po ICSI 26 % vs. 6 %). V této publikaci však bylo přenášeno více embryí, někdy i v kombinaci „rychlá a pomalá“ embrya a nešlo prokázat, které embryo opravdu implantovalo. Významným přínosem pro průkaz vlivu nástupu dělení je ale např. práce Salumets *et al.* (2003), kteří prokázali, že nástup prvního buněčného dělení má velký vliv na životaschopnost, úspěšnost implantace a vznik těhotenství v souboru 178 cyklů s přenosem **jediného** vybraného embrya eSET (36 % klinicky prokázaných gravidit v celém souboru). Ačkoliv rychlost nástupu prvního buněčného dělení nebyla hlavním kritériem pro výběr embrya k transferu, ukázalo se, že při transferu EC embrya byl dosažen PR až 50 %, zatím co při transferu NEC embryí to bylo jen 27 %. V publikaci Březinová *et al.* (2009) se uvádí, že v případě transferu dvou EC embryí je pravděpodobnost otěhotnění dvakrát vyšší a implantace třikrát vyšší než po přenosu embryí se zpožděným nástupem dělení NEC. Tento závěr podporuje názor některých odborníků, kteří uvádějí, že EC embrya mají výrazně vyšší vývojový potenciál než NEC (Lundin *et al.*, 2001, Van Montfoort *et al.*, 2004).

Na rychlost nástupu prvního buněčného dělení mají vliv obě pohlavní buňky – kvalita oocytů i spermií. Uvádí se, že nástup prvního buněčného dělení může souviset s lepší synchronizací zralosti cytoplazmy i jádra oocytů nebo s tím, že zralé oocyty mohou lépe využívat dostupné ATP či maternální mRNA před aktivací vlastního embryonálního genetického vybavení. Častěji se embryologové setkávají s EC embryí po použití metody ICSI. Tato skutečnost může být způsobena tím, že během klasického IVF mohou být spermie přidány k nezralému oocytu, avšak pro metodu ICSI bývají používány oocyty v metafázi II. Vliv na nástup prvního buněčného dělení může mít i samotné technické provedení ICSI, při kterém se obchází řada procesů přirozené fertilizace oocytu, např. kapacitace spermií nebo jejich navázání na ZP, tím se fertilizační proces zkracuje (Březinová, 2005). Rychlost nástupu prvního buněčného dělení je pravděpodobně ovlivněna i přítomností viditelného dělicího vřeténka a jeho strukturou. U zralých neoplozených oocytů je délka dělicího vřeténka  $11,2 \pm 3,4 \mu\text{m}$ , je-li oocyt starší, délka vřeténka se zkracuje. Dojde-li ke kontaktu spermií s oocytem, ale k fertilizaci nedojde, je délka dělicího vřeténka pouze  $8,08 \pm 0,84 \mu\text{m}$  (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2002). Byla provedena studie zabývající se dobou nástupu prvního buněčného dělení po použití metody ICSI, která kontrolovala viditelnost dělicího vřeténka. Bylo prostudováno celkem

540 oocytů, z nichž u 202 bylo dělicí vřetenko viditelné a z 91,6 % těchto oocytů vznikla EC embrya (Zhu *et al.*, 2004).

**Počet cyklů ukončených bez ET** je častějším jevem při *in vitro* kultivaci do 5. dne vývoje embrya, kdy v tento den nejsou přítomna embrya vhodná k přenosu. V *in vivo* podmínkách vstupuje embryo do dělohy během 4. dne svého vývoje, kdy je embryo neaktivnější, protože u něj dochází k aktivaci genomu a tato vyšší aktivita se může projevit i vyšší schopností implantace. Embryo transferované 3. den kultivace se dostává dříve do přirozeného prostředí dělohy, které může lépe ovlivňovat tuto aktivaci, než podmínky v inkubátoru při *in vitro* kultivaci.

Dojde-li u embrya k pomalému nástupu prvního buněčného dělení, záleží na zkušenostech embryologa a domluvě s léčeným párem na délce kultivace a provedení transferu NEC embrya/í do dělohy. U některých NEC embryí během prodloužené kultivace nedochází k dalšímu vývoji – kompaktaci, vzniku blastocysty a cyklus je ukončen bez ET. V námi porovnávaných souborech nedošlo k zástavě dělení (mezi dvěma hodnoceními došlo prokazatelně k dalšímu dělení embrya) embryí během 72 hodin kultivace (3D soubor) a tedy ani k jednomu zastavení cyklu bez přenosu embryí. V souboru 5D, při pětidenní kultivaci (120 hodin) embrya došlo k ukončení 16,4 % cyklů bez ET. Rozdíl v počtu cyklů bez ET u 3D vs. 5D souboru byl statisticky významný (0 vs. 33,  $p = 0,000$ ). Podobné závěry uvádí i Kolibianakis *et al.* (2004), v jejich souborech u embryí kultivovaných do 3. dne došlo k zástavě vývoje v 1,8 % případů a při prodloužené kultivaci do 5. dne bylo ukončeno bez ET 9,1 % cyklů ( $p < 0,001$ ).

Kolibianakis *et al.* (2004) a Coskun *et al.* (2000) uvádějí, že pokud není prodloužená doba kultivace *in vitro* nezbytně nutná, je vhodnější transfer embrya 3. den kultivace, jelikož u prodloužených cyklů do 5. dne se snižuje možnost kryokonzervace embryí a zvyšuje se počet cyklů, které jsou ukončeny bez ET. Podle těchto autorů však transfer embryí s prodlouženou dobou kultivace nesnižuje pravděpodobnost otěhotnění pacientky a ani nezvyšuje množství raných těhotenských ztrát.

Na výsledku cyklu ART má významný podíl také **počet transferovaných embryí**. Jedním z hlavních problémů metod asistované reprodukce je vyšší výskyt vícečetných těhotenství, než je v běžné populaci po přirozeném početí. Tento jev je způsoben transferem více embryí. Vhodně zvolené parametry pro výběr nejkvalitnějšího a nejživotaschopnějšího embrya by měl výskyt vícečetných těhotenství eliminovat. Nejčastěji se transferují 1 – 3 embrya dle jejich kvality nebo celkového počtu. V Centru asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky LF a FNOL se přenášejí

maximálně tři embrya, standardní je přenos dvou embryí a jediné embryo je přenášeno (eSET) při jeho nejvyšší kvalitě a po domluvě s párem.

V souboru s třídní kultivací byla v průměru přenesena  $2 \pm 0,5$  embrya, po kultivaci do 5. dne to bylo statisticky významně méně,  $1,8 \pm 0,5$  embrya ( $p = 0,000$ ). Pokles počtu přenášených embryí byl zřejmě ovlivněn menším počtem embryí vhodných k přenosu (zástava dělení, vakuolizace, lýza). Tento jev může být ovlivněn jednak kvalitou a vitalitou pomalu se dělících embryí, jednak možnými suboptimálními podmínkami *in vitro* kultivace. V souladu s naším výsledkem je práce Beesley *et al.* (2009), kteří také po prodloužené kultivaci transferovali statisticky významně méně embryí (po třídní kultivaci 2,52 vs. po 5 dnech 1,99,  $p = 0,001$ ), zatím co u Coskuna *et al.* (2000) Kolibianakise *et al.* (2004) se počet přenášených embryí v obou hodnocených souborech nelišil (Tab. 7).

Tab. 7: Průměrný počet přenášených embryí v literárních zdrojích

Zdroj	3D embrya	5D embrya	Stat. sign. (p)
<b>Coskun <i>et al.</i>, 2000</b>	2,3 ± 0,6	2,2 ± 0,5	NS
<b>Kolibianakis <i>et al.</i>, 2004</b>	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	NS
<b>Beesley <i>et al.</i>, 2009</b>	2,52	1,99	0,001
<b>CAR FNOL 2011</b>	<b>2 ± 0,5</b>	<b>1,8 ± 0,5</b>	<b>0,000</b>

Legenda:

NS – statisticky neprůkazný rozdíl,  $p > 0,05$

Stat. sign. – statisticky signifikantní

3D – soubor s 3. denní kultivací

5D - soubor s 5. denní kultivací

Jedním ze zásadních vstupních parametrů, který ovlivňuje celkový výsledek je **kvalita a vývojové stádium přenášeného embrya**. U zdravě vyvíjejícího se embrya dochází za 22 – 25 hodin po inseminaci k nástupu prvního buněčného dělení, druhý den kultivace je většina embryí čtyřbuněčná. Třetí den od oplození by embryo mělo být v osmibuněčném stádiu, pátý den od oplození by se pak mělo nacházet ve stádiu blastocysty (Campbell *et al.*, 2008).

Z řady studií jasně vyplývá, že embrya s rychlým nástupem dělení (EC) mají během druhého i třetího dne dělení signifikantně vyšší počet blastomer než NEC embrya. Za 42 hodin po oplození bylo ve čtyřbuněčném stádiu 87 % EC embryí, což je téměř dvojnásobně více než u NEC, kde dosáhlo čtyřbuněčného stádia pouze 45,3 % embryí (Edgar *et al.*, 2004). U NEC embryí bylo během 3. dne kultivace pozorováno nejčastěji



šestibuněčné stádium (Lundin *et al.*, 2001). Při porovnávání počtu blastomer 3. den kultivace byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p = 0,000$ ) mezi embryi rychle se dělícími ( $EC = 7,73 \pm 1,59$  blastomer), embryi s rozpuštěnou karyolemou ( $BDPN = 7,01 \pm 1,86$ ) a zachovanými prvojádry ( $PN 6,05 \pm 1,98$ ) (Březinová, 2005).

V námi porovnávaném souboru byl průměrný počet blastomer u transferovaných třídenních embryí  $7,5 \pm 1,3$ . Tento údaj je v souladu s publikovanými údaji z této laboratoře, kdy počet blastomer u přenášených NEC embryí byl  $7,75 \pm 1,37$  po IVF a  $7,60 \pm 1,34$  po ICSI (Březinová, 2005).

Ve skupině třídenních NEC embryí bylo vždy preferencí transferovat embrya s pravidelným dělením a s počtem blastomer nejvíce se blížícím očekávanému stádiu vývoje pro tento den tak, aby se zvýšila pravděpodobnost implantace a úspěšnosti cyklu. Salumets *et al.* (2003) publikovali výborné výsledky po selektivním transferu jediného embrya, které mělo v době transferu (2. den kultivace) větší počet blastomer. Při eSET pouze EC čtyřbuněčných embryí byl dosažen vyšší PR, v porovnání s přenosem NEC embryí s nižším počtem blastomer (50,7 % vs. 32,5 %).

V našem souboru pět dnů kultivovaných NEC embryí, dosáhlo stádia moruly 33 %, počínající blastocysty v 50 % nebo expandované blastocysty pouze 17 %. Obecně i v souladu s mými dosaženými výsledky lze říci, že NEC embrya prodlouženou kultivací do 5. dne dosahují vývojového stádia blastocysty ve srovnání s EC embryi méně často (Veeck *et al.*, 2001). K obdobným závěrům dospěly i jiné studie, např. Isiklar *et al.* (2002) zaznamenali 56,7 % blastocyst u EC embryí, u NEC embryí dosáhlo tohoto stádia pouze 25 % embryí. Existuje určitá korelace mezi vývojovým stádiem přenášených embryí a úspěšným otěhotněním pacientky. Transferem po pětidenní kultivaci ve stádiu blastocysty se lépe embryo synchronizuje s prostředím dělohy. Vliv na dosažení těhotenství má i kvalita přenášené blastocysty. Kvalitu pětidenního embrya můžeme odvozovat i z hodnocení časných vývojových stádií embryí. Třídenní embrya s fragmentací méně než 10 % častěji dosáhla 5. den stádia expandované blastocysty. Při přenosu jedině expandované blastocysty bylo zaznamenáno více klinických těhotenství než při transferu moruly, či počínající blastocysty (della Ragione *et al.*, 2007).

## 10.2 Výstupní parametry

Dosažený počet těhotenství na započatý cyklus v obou souborech (v souboru 5D jsou započteny i cykly bez přenosu embryí) je bez statistické významnosti (PR/cyklus 37 % soubor 3D vs. 42 % souboru 5D,  $p > 0,05$ ).

Při porovnávání počtu dosažených klinických těhotenství a implantačního poměru vztažených k embryotransferu již byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly v PR ( $p = 0,001$ ) a IR ( $p = 0,001$ ). Více těhotenství a vyšší implantační poměr byl zaznamenán u pacientek s pětidenní kultivací *in vitro*, přestože byl přenášen signifikantně nižší počet embryí ( $p = 0,000$ ).

Na rozdíl od našich výsledků, Coskun *et al.* (2000) neprokázali pozitivní vliv prodloužené kultivace na výsledky IVF a ET, v obou souborech (po tří- i pětidenní kultivaci) dosáhli PR/ET 39 %, Kolibianakis *et al.* (2004) dosáhli ještě nižšího PR (32,1 % po třídenní vs. 33,2 % po pětidenní kultivaci, NS). V našem souboru bylo dosaženo vyššího počtu klinicky potvrzených těhotenství v obou souborech, ale zejména po prodloužené kultivaci (PR/ET 50 % v souboru 5D) v porovnání s Kolibianakisem *et al.* (2004).

Statisticky vyšší **implantační poměr (IR)** je v dostupných literárních zdrojích uváděn po transferu embryí s prodlouženou dobou kultivace do 5. dne vývoje (Tab. 8). Nejvyšší IR uvádějí Coskun *et al.* (2000) pro 3D embrya. Ve své publikaci necharakterizují, zda byla transferována embrya EC nebo NEC. Avšak zdůrazňují, že k transferu do dělohy byla vždy vybrána dvě nejkvalitnější embrya. Pouze u párů, které už prodělaly více než šest cyklů nebo u žen starších 36-ti let byla přenášena tři embrya. Beesley *et al.* (2009) vykazují nejlepší IR pro 5D embrya. Ve své publikaci uvádějí, že hlavním kritériem pro prodlouženou kultivaci do 5. dne byl počet blastomer (minimálně 7 – 8) a fragmentace nižší než 10 %. Při hodnocení IR v našich souborech byl statisticky signifikantně vyšší IR dosažený v souboru 5D (po třídenní 25 % vs. 36 % po pětidenní kultivaci,  $p = 0,001$ ). Vyšší IR ve skupině 5D embryí lze vysvětlit tím, že při prodloužené kultivaci *in vitro* do 5. dne vývoje embrya, je možné rozlišit embrya s vyšší životaschopností a implantačním potenciálem. Výběr embrya během 3. dne kultivace je založen hlavně na morfologických parametrech, např. velikost blastomer nebo stupeň fragmentace, avšak při výskytu většího počtu stejně vypadajících embryí v daném cyklu, lze obtížněji odhadovat, která z nich mají vyšší implantační potenciál. Prodloužená kultivace do 5. dne tak může pomoci odhalit embrya s nižším implantačním potenciálem, u kterých dochází k zástavě jejich vývoje (della Ragione *et al.*, 2007).

Tab. 8: Procentuálně vyjádřený IR v dostupných literárních zdrojích

Zdroj	3D embrya	5D embrya	Stat. sign. (p)
<b>Coskun <i>et al.</i>, 2000</b>	50	52	NS
<b>Kolibianakis <i>et al.</i>, 2004</b>	24,5 ± 2,5	26,6 ± 2,7	NS
<b>Beesley <i>et al.</i>, 2009</b>	42,1	56,4	-
<b>CAR FNOL 2011</b>	<b>25</b>	<b>36</b>	<b>0,001</b>

Legenda:

NS – statisticky neprůkazný rozdíl,  $p > 0,05$

Stat. sign. – statisticky signifikantní

Při přenosu třídních NEC embryí bylo zaznamenáno méně **těhotenských ztrát** do 12. týdne než u pětidenních NEC embryí (11 % vs. 16 %), avšak jako statisticky významný se tento rozdíl nepotvrdil. Podobný počet těhotenských ztrát dosáhli i Kolibianakis *et al.* (2004), kteří uvádí počet abortů po transferu 3. den kultivace 10,4 % a po 5. dnu kultivace 6,4 % těhotenských ztrát.

V námi zpracovávaném souboru došlo po 12. týdnu gravidity k dalším těhotenským ztrátám, které tvořily v souboru 3D 3 % (3 AB) a v souboru 5D 8 % (6 AB). Coskun *et al.* (2000) ve své publikaci nerozlišuje rané a pozdní těhotenské ztráty, uvádí jen jejich celkový počet v porovnávaných souborech 5 AB po třídní vs. 3 těhotenské ztráty po pětidenní kultivaci, při vyjádření počtu AB u 3D vs. 5D je procentuální zastoupení těhotenských ztrát 12 % vs. 8 %.

**Počet těhotenství ukončených porodem** je vyšší v souboru s přenosem třídních embryí (86,4 % vs. 76,7 %, NS), tyto porody jsou vztaženy na dosažené klinické těhotenství.

Studie na zvířecích modelech ukázaly, že embrya ženského **pohlaví** se dělí pomaleji, než-li embrya mužského pohlaví (Březinová, 2005). Na souboru 105 porodů, kterým předcházela transfer EC embrya, byl Lundinovou *et al.*, (2001) zjištěn poměr pohlaví děvče : hoch 50 : 50. Při transferu NEC embryí a následných 125 porodech byl poměr pohlaví 47 : 53. V námi porovnávaných souborech NEC embryí byl poměr hoch : děvče (%) vždy ve prospěch ženského pohlaví, u třídních embryí 42 : 58 a u pětidenních embryí 41 : 59. Z dosažených výsledků lze usuzovat, že rozdíl v rychlosti dělení mezi pohlavími se nejspíš projevuje jen na počátku transkripce genomu, ale nemá vliv na další vývoj a implantaci embrya.

Metody ART jsou často spojovány s vyšším zastoupením **vícečetných těhotenství**, než jaké se vyskytuje po přirozeném početí. Důvodem vzniku vícečetného těhotenství je stimulace vaječnicků pomocí hormonálních léků během léčby neplodnosti (Ozturk *et* Templeton, 2002), další příčinou je transfer většího počtu embryí do dělohy. Vzácněji dochází k rozdělení jednoho embrya, kdy při jeho dalším vývoji vznikají dva plody tzv. jednovaječná dvojčata (Pennings *et* de Wert, 2003). Nárůst vícečetných těhotenství po IVF je čtyřistakrát vyšší než u běžné populace. Průzkumem, který proběhl v USA v roce 2002, bylo registrováno, že ze všech dětí narozených za pomoci metod ART bylo 58 % jedináčků, 29 % dvojčat a zbylých 7 % tvoří narozená trojčata i vícčata. Obdobným průzkumem provedeným v Evropě v roce 2001 bylo zaznamenáno, že 75 % dětí narozených za pomoci metod asistované reprodukce bylo jedináčků, dvojčata s 24 % tvořila druhou nejpočetnější skupinu a zbylé 1,5 % narozených dětí byla trojčata (Bhattacharya, 2007). V námi porovnávaných souborech se také vyskytovala vícečetná těhotenství. V souboru 3D se to bylo 33 % dvojčetných těhotenství, v souboru 5D bylo 23 % dvojčetných a 1 % trojčetných těhotenství. Jednalo se o 5. cyklus a na přání pacientky byla transferována tři embrya, do 12. týdne došlo ke spontánní redukci a porozen byl jeden plod (hoch). Nižší zastoupení vícečetných těhotenství v souboru 5D může být ovlivněno nižším počtem transferovaných embryí ( $1,8 \pm 0,5$  vs.  $2 \pm 0,5$ ,  $p = 0,000$ ).

V souboru 3D nebyl proveden žádný indukovaný potrat pro VVV plodu, v souboru 5D byly tyto zákroky provedeny třikrát (3,4 % z počtu klinických těhotenství). V běžné populaci se VVV vyskytují v různém rozsahu postižení asi u 3 % případů. U žen po 40. roku věku stoupá riziko VVV plodu. Vzhledem k věku sledovaných pacientek je výskyt VVV v souladu s obecnými znalostmi a zřejmě nebude významně ovlivněn procesy asistované reprodukce. Jednalo se o starší pacientky (38, 38 a 39 let). Källén *et al.* (2010) se ve své studii zabývali tím, jaký vliv má vývojová fáze přenášeného embrya, na úspěšné zakončení cyklu IVF porodem zdravého dítěte. Zjistili, že vyšší výskyt předčasných porodů i VVV u jednočetných těhotenství je po transferu blastocysty. Zvýšení výskytu předčasných porodů a VVV je pravděpodobně způsobeno delším pobytem embrya v *in vitro* podmínkách.

## 11 Závěr

V diplomové práci jsem se zabývala úspěšností IVF a ET po přenosu embryí s pomalým nástupem dělení tzv. *no early cleavage* (NEC). Za embrya s pomalým nástupem dělení považujeme ta, u kterých proběhne první buněčné dělení později než za 25 hodin po oplození oocyty. V této práci je statisticky hodnocena významnost vstupních i výstupních parametrů a výsledky dosažených těhotenství u dvou porovnávaných souborů, lišících se délkou kultivace – NEC embrya přenášená po kultivaci do třetího vs. pátého dne vývoje v *in vitro* podmínkách.

Podmínkou pro zařazení do hodnoceného souboru byla přítomnost pouze pomalu se dělících embryí. Hodnocení embryologické části léčebného cyklu prováděl jediný embryolog (vedoucí diplomové práce RNDr. Jana Březinová, Ph.D). Celkově bylo hodnoceno 542 léčebných cyklů, u 338 (tj. 62,4 %) proběhl přenos embrya po třídenní (soubor 3D) a 204 cyklů (tj. 37,6 %) bylo s pětidenní prodlouženou kultivací (soubor 5D). Oplozování probíhalo v 77 % pomocí metody ICSI.

Při statistickém hodnocení **vstupních parametrů** souborů 3D vs. 5D nebyly zjištěny průkazné rozdíly ve věku pacientek ( $33,0 \pm 4,5$  vs.  $33,4 \pm 4,2$ ) a *fertilization rate* (FR) (74 % vs. 75 %). Statisticky významný byl zjištěn rozdíl v počtu transferovaných embryí ( $2 \pm 0,5$  vs.  $1,8 \pm 0,5$ ,  $p = 0,000$ ), neboť v souboru 5D se přenášelo méně embryí. Další statisticky významný rozdíl u 3D vs. 5D souborem byl v počtu zrušených cyklů bez ET (0 vs. 33,  $p = 0,000$ ).

Po třídenní kultivaci byla přenášena embrya s průměrným počtem  $7.5 \pm 1,3$  blastomer, nejčastěji to byla embrya v osmibuněčném stádiu. Po pětidenní kultivaci se nejčastěji přenášela embrya ve stádiu počínající blastocysty.

Při statistickém hodnocení **výstupních parametrů** souborů 3D vs. 5D nebyl zjištěn průkazný rozdíl v počtu potvrzených biochemických (45 % vs. 46,5 %) a klinických těhotenství (37 % vs. 42 %) na započatý cyklus. Naopak byl nalezen statisticky významný rozdíl v PR vztažený na přenos embrya (ET) (37 % vs. 50 %,  $p = 0,001$ ) a IR (25 % vs. 36 %,  $p = 0,001$ ). U cyklů s prodlouženou pětidenní kultivací bylo dosaženo více těhotenství a došlo k implantaci více embryí. Nebyly zjištěny průkazné rozdíly v počtu těhotenských ztrát do 12. týdne (11 % vs. 16 %).

V souboru 3D porodilo 86,4 % pacientek ze všech klinicky potvrzených těhotenství (108/125). Porozeno bylo 60 hochů a 82 děvčat. V souboru 5 D skončilo porodem 76,7 % klinicky potvrzených těhotenství (66/86). Narodilo se 37 chlapců a 53 děvčat. Srovnání počtu porodů v souboru 3D vs. 5D není statisticky signifikantní. V souboru 3D nebyl

proveden ani jeden indukovaný potrat pro zjištěnou vrozenou vývojovou vadu plodu, oproti souboru 5D, ve kterém byl tento výkon proveden třikrát.

I přes dosažení lepšího výsledku PR a IR po přenosu embryí po pětidenní kultivaci, je v praxi nutné vždy přistupovat k jednotlivým případům individuálně a brát na zřetel celkovou anamnézu páru – počet a průběh prodělaných cyklů, počet odebraných a úspěšně oplodněných oocytů v právě probíhajícím cyklu, kvalitu embryí atd. Dále je nutné zohlednit i velkou psychickou zátěž páru jestliže je cyklus ukončen bez transferu embrya nebo při nutnosti provést indukované ukončení těhotenství pro zjištěnou vrozenou vývojovou vadu plodu, která byla častější po transferu embryí po pětidenní kultivaci.

Závěrem shrnujeme, že i ve světle dosažených výsledků je nezbytné, aby byl každý případ individuálně posouzen lékařem, embryologem a s ohledem na přání léčeného páru byl navržen neoptimálnější postup.

## 12 Seznam použité literatury

1. **Abbott, D. H.**, Foong, S. C., Barnett, D. K., Dumesic, D. A. (2004): Nonhuman primates contribute unique understanding to anovulatory infertility in women. *ILAR Journal* 45: 116 – 131.
2. **Agarwal, A., Allamaneni, S. S. R.** (2004): Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal* 9: 187 – 197.
3. **Aitken, R. J.** (1994): A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 19 – 24.
4. **Aitken, R. J.** (1994): A pathophysiology of human spermatozoa. *Curr. Opin. Obstet.* 6: 128 – 135.
5. **Alberts, B.**, Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998): *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing, 2. vydání, ISBN 80-902906-2-0
6. **Alikani, M.**, Calderon, G., Tomkin, G., Garrisi, J., Kokot, M., Cohen, J. (2000): Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human Reproduction* 15: 2634 – 2643.
7. **Avidan, N.**, Tamary, H., Dgany, O., Cattan, D., Pariente, A., Thulliez, M., Borot, N., Moati, L., Barthelme, A., Shalmon, L., Krasnov, T., Ben-Asher, E., Olender, T., Khen, M., Yaniv, I., Zaizov, R., Shalev, H., Delaunay, J., Fellous M., Lancet, D., Beckmann, J. S. (2003): CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *European Journal of Human Genetics* 11: 497 – 502.
8. **Balaban, B.**, Urban, B., Alatas, C., Mercan, R., Mumcu, A., Isiklar, A. (2002): A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Human reproduction Oxford England* 17: 1239 – 1243.

9. **Barratt, Ch. L. R.,** Kay, V., Oxenham, S. K. (2009): The human spermatozoon – a stripped down but refined machine. *Journal of Biology* 8: 63.1 – 63.4.
10. **Bhattacharya, S.** (2007): Assisted conception and multiple pregnancies: methods of reducing multiples from assisted reproduction. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 2: 541 - 544.
11. **Beesley, R.,** Robinson, R., Propst, A., Arthur, N., Retzliff, M. (2009): Impact of day 3 or day 5 embryo transfer on pregnancy rates and multiple gestations. *Fertil. Steril.* 91: 1717 – 1720.
12. **Boiso, I.,** Veiga, A., Edwards, R. G. (2002): Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod Biomed Online* 5: 328 – 350.
13. **Borovský, M., Křišťůvková, A.** (2009): Diferenciálna diagnostika poruch menštruačného cyklu. *Ambulantna terapia* 7: 18 – 22.
14. **Brown, C. R., Cheng, W. K. T.** (1986): Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 92: 183 – 191.
15. **Březinová, J.** (2005): Rychlost nástupu prvního buněčného dělení a její vliv na kvalitu a úspěšnost IVF a ET. Školitel Prof. MUDr. Václav Lichnovský, DrSc. Disertační práce, pp. 99.
16. **Březinová, J.,** Labanová, M., Dostál, J., Oborná, I., Machač, Š., Kudela, M. (2001): Zkrácená expozice spermií s oocyty při klasickém IVF. *Česká Gynekologie* 66: 318 – 321.
17. **Březinová, J.,** Oborná, I., Svobodová, M., Kršková, M., Fingerová, H., Machač, Š. (2003): Embrya s časným dělením (early cleavage) a jejich vliv na výsledky klasického IVF. *Čes. Gynek.* 6: 449 – 453.



18. **Březinová, J., Oborná, I., Svobodová, M., Fingerová, H.** (2009): Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome – a comparison of two scoring systems. *Reproductive Biology and Endocrinology*, dostupný na WWW <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19192281>> [cit. 2011- 20-05]
19. **Campbell, N. A., Reece, J. B.** (2008): *Biologie*, Computer Press, 1. vydání, ISBN 80-251-1178-4
20. **Cohen, P. E., Holloway, J. K.** (2010): Predicting Gene Networks in Human Oocyte Meiosis. *Biology of Reproduction* 82: 469 – 472.
21. **Conaghan, J., Hardy, K., Leese, H. J., Winston, R. M. L., Handyside, A. H.** (1998): Culture of human preimplantation embryos to the blastocyst stage: a comparison of 3 media. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 885 – 893.
22. **Corabian, P., Scott, A.** (2004): Ovulation induction drug therapy for anovulatory infertility associated with polycystic ovary syndrome, Alberta Heritage Foundation for Medical Research, 1. vydání, ISBN 1-896956-87-4
23. **Coskun, S., Hollanders, J., Al-Hassan, S., Al-Sufyan, H., Al-Mayman, H., Jaroudi, K.** (2000): Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Human Reproduction* 15: 1947 – 1952.
24. **Čepický, P., Líbalová, Z.** (2007): Gynekologická pánevní bolest. *Moderní babičství* 14: 1 – 9.
25. **della Ragione, T., Verheyen, G., Papanikolaou, E. G., Van Landuyt, L., Devroey, P., Van Steirteghem, A.** (2007): Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single embryo transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology*, dostupné na WWW: <<http://www.rbej.com/content/5/1/2/abstract>> [cit. 2011- 20-05]

26. **Depa-Martynów, M.**, Kempisty, B., Lianeri, M., Jagodziński, P. P., Jędrzejczak, P. (2007): Association between fertilin, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia histochemica et cytobiologia* 45: 79 – 85.
27. **Dickens, B. M.** (2005): Preimplantation genetic diagnosis and savior siblings. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 88: 91 - 96.
28. **Dozortsev, D.**, Ermilov, A., El-Mowafi, D. M., Diamond, M. (1998): The impact of cellular fragmentation induced experimentally at different stages of mouse preimplantation development. *Human Reproduction* 13: 1307 – 1311.
29. **Dunson, D. B.**, Baird, D. D., Colombo, B. (2004): Increased infertility with age in men and women. *The American College of Obstetricians and Gynecologists* 103: 51 – 56.
30. **Ebner, T.**, Moser, M., Sommergruber, M., Tews, G. (2003): Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Human Reproduction* 9: 251 – 262.
31. **Edgar *et al.***, (2004): Timing of syndamy predicts implantation in IVF embryos. *Human Reproduction* 19: Abstract Book, 411.
32. **Eichenlaub-Ritter, U.**, Shen, Y., Tinneberg, H. R. (2002): Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online* 5: 117 – 124.
33. **Eisenbach, M.**, **Tur-Kaspa, I.** (1999): Do human eggs attract spermatozoa? *BioEssays* 21: 203 – 210.
34. **Fancovics, P.**, Takacs, F. Z., Tothne, G. Z., Papp, Z., Urbancsek, J. (2006): Examination of early cleavage and its importance in IVF treatment. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 3: 367 – 372.

35. **Fetterolf, P. M.**, Jurisicova, A., Tyson, J. E., Casper R. F. (1994): Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biology of Reproduction* 51: 184 – 192.
36. **Fingerová, H.**, Oborná, I., Novotný, J., Svobodová, M., Březinová, J., Radová, L. (2009): The measurement of reactive oxygen species in human neat semen and in suspended spermatozoa: a comparison. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 118 – 124.
37. **Forti, G., Krausz, C.** (1998): Evaluation and treatment of the infertile couple. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83: 4177 - 4188.
38. **Gianaroli, L.** (2000): Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy. *Human Reproduction* 15: 69 - 75.
39. **Golubovsky, M., Manton, K. G.** (2005): A three-generation approach in biodemography is based on on the developmental profiles and the epigenetic of femal gametes. *Frontiers in Bioscience* 10: 187—191.
40. **Hammadeh, M. E.**, Hammadeh, C. F., Ali, K. R. (2011): Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 28: 119 – 128.
41. **Hauser, R.**, Paz, G., Botchan, A., Yogev, L., Yavetz, A. (2001): Varicocele effect on sperm functions. *Human Reproduction* 7: 482 - 485.
42. **Horng, S. G.**, Chang, Ch. L., Wu, H. M., Wang, Ch. W., Cheng, Ch. K., Huang, H. Y., Wang, H. S., Soong, Y. K. (2002): Laser-assisted hatching of embryos in women of advanced age after in vitro fertilization: A preliminary report. *Chang Gung Med. J.* 25: 531 – 537.
43. **Horsham, P. A.** (2006): New sperm selection technology for assisted reproductive technology (ART) cleared by FDA, dostupný na WWW: <<http://www.prweb.com/releases/2006/07/prweb407895.htm>> [cit. 2011- 20-05]

44. **Hovatta, O., Cooke, I.** (2006): Cost-effective approaches to in vitro fertilization: Means to improve access. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 94: 287 - 291.
45. **Hudeček, R., Prokopová, I., Svitekova, M., Krajčovičová, R.** (2010): Terapeutické možnosti asistované reprodukce u pacientek se sníženou ovariální rezervou. *Praktická gynekologie* 14: 26 – 35.
46. **Chang, C. C., Shapiro, D. B., Bernal, D. P., Wright, G., Kort, H. I., Nagy, Z. P.** (2008): Human oocyte vitrification: in-vivo and in-vitro maturation outcomes. *Reprod Biomed Online* 17: 684 – 688.
47. **Chavarro, E. J., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., Willett, W. C., Nutr, A. J. C.** (2007): American society for nutrition, dietary fatty acid intakes and the risk of ovulatory infertility. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85: 231 - 237.
48. **Isiklar, A., Mercan, R., Balaban, B., Alatas, C., Aksoy, S., Urman, B.** (2002): Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of reproductive medicine* 47: 540 – 544.
49. **Joris, H., Van den Abbeel, E., De Vos, A., Van Steirteghem, A.** (2005): Cryopreservation of biopsied cleavage stage human embryo. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 711 - 715.
50. **Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. S., Wassarman, P. M.** (2007): Features that affect secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins during mammalian oogenesis. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 63: 187 - 201.
51. **Juriscova, A., Varmuza, S., Casper, R. F.** (1996): Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 93 – 98.

52. **Källén, B.**, Finnström, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K. G., Olausson, P.O. (2010): Blastocyst versus cleavage stage transfer in in vitro fertilization: differences in neonatal outcome? *Fertil. Steril* 94: 1680 – 1683.
53. **Kääriäinen, H.** (2006): The need for interaction between assisted reproduction technology and genetics. *European Journal of Human Genetics* 14: 509 - 511.
54. **Kočvara, R.** (2004): Kryptorchismus. *Urologie pro praxi* 5: 194 - 197.
55. **Kolibianakis, E. M.**, Zikopoulos, K., Verpoest, W., Camus, M., Joris, H., Van Steirteghem, A. C., Devroey, P. (2004): Should we advise patients undergoing IVF to start a cycle leading to a day 3 or a day 5 transfer? *Human Reproduction* 19: 2550 – 2554.
56. **Kong, M.**, Diaz, E. S., Morales, P. (2009): Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biology of Reproduction* 80: 1026 – 1035.
57. **Lampé, L. G.** (1988): Uterine surgery of sterility. *Human Reproduction* 3: 187 – 192.
58. **Lechniak, D.**, Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P. (2007): Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reproductive Biology* 8: 23 – 42.
59. **Lewis, R.** (2003): Male factor infertility. Eastern Harmony Medical Acupuncture Clinic, dostupný na WWW: <[http://www.acudenver.com/\\_docs/ArticlesRL5.pdf](http://www.acudenver.com/_docs/ArticlesRL5.pdf)> [cit. 2011- 20-05]
60. **Mayer, E. R.**, McCrory, D. C., Mills, A. A., Price, T. M., Swamy, G. K., Tantibhedhyangkul, Julierut, Wu, Jennifer M., Matchar, David B. (2008): Effectiveness of assisted reproductive technology. *Evidence Report/Technology Assessment* 167: 1 – 195.

61. **Lundin, K.,** Bergh, C., Hardarson, T. (2001): Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Human Reproduction* 16: 2652 – 2657.
62. **Montag, M., van der Ven, H.** (1999): Laser-Assisted Hatching in Assisted Reproduction. *Croatian Medical Journal* 40: 398 – 403.
63. **Morales, P., Llanos, M.** (1996): Interaction of human spermatozoa with the *zona pellucida* of oocyte: development of the acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience* 1: 146 – 160.
64. **Nagy, Z. P.,** Liu, J., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A. (1994): Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* 9: 1743 – 1748.
65. **Nakamura, S.,** Terada, Y., Horiuchi, T., Emuta, Ch., Murakami, T., Yaegashi, N., Okamura, K. (2001): Human Sperm Aster Formation and Pronuclear Decondensation in Bovine Eggs Following Intracytoplasmic Sperm Injection Using a Piezo-Driven Pipette: A Novel Assay for Human Sperm Centrosomal Function. *Biology of Reproduction* 65: 1359 – 1363.
66. **Nasr-Esfahani, M.,** Johnson, M. H., Aitken, R. J. (1990): The effect of iron and iron chelators on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. *Human Reproduction* 5: 997 – 1003.
67. **Naz, R. K.** (2006): Antisperm immunity for contraception. *Journal of Andrology*, 27: 153 - 159.
68. **Nečas, O.,** Červinka, M., Hejtmánek, M., Kolář, Z., Lenhart, K., Svoboda, A. (2000): *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, H&H, 3. vydání, ISBN 80-86022-46-3

69. **O'Brien, J. H.**, Bowles, B., Kamal, K. M., Jarvi, K., Zini, A. (2004): Microsurgical varicocelectomy for infertile couples with, advanced female age: natural history in the era of ART. *Journal of Andrology* 25: 939 - 943.
70. **O'Day, D. H.** (2010): Formation of The Male Sex Cells: Male Anatomy and Spermatogenesis. *Human Development*, pp. 1 – 7.
71. **Ozturk, O., Templeton A.** (2002): Multiple pregnancy in assisted reproduction techniques. In: Vayena, E., Rowe, J. P., Griffin, P. D., (eds.): *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction*, pp. 220 – 234, World Health Organization, Ženeva.
72. **Palermo, G. D.**, Schlegel, P. N., Hariprashad, J. J., Ergu, B., Mielnik, A., Zaninovic, N., Veeck L. L., Rosenwaks, Z. (1999): Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Human Reproduction* 14: 741 - 748.
73. **Payne, D.**, Flaherty, S., P., Barry, M. F., Matthews, C. D. (1997): Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction* 12: 532 – 541.
74. **Pennings, G., de Wert, G.** (2003): Evolving ethnics in medically assisted reproduction. *Human Reproduction* 9: 397 - 404.
75. **Pinheiro, R. C.**, Lambert, J., Bénard, F., Mauffette, F., Miron, P. (1999): Effectiveness of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection for severe male infertility. *Canadian Medical Association or its licensors* 161: 1397 - 1401.
76. **Rob, L.**, Martan, A., Citterbart, K., *et al.* (2008): *Gynekologie*, Galén Praha, 2. vydání, ISBN: 978-80-7262-501-7
77. **Řežábek, K.** (2008): *Asistovaná reprodukce*, Maxdorf Praha, 1. vydání, ISBN 978-80-7345-154-7

78. **Sagiry, T.**, Miyako, F., Hiroaki, U., Terumi, H., Khalid, E. B., Namiko, A., Yoshitaka, M. T. N. (2009): A comparison of day-3 versus day-2 and day-5 versus day-4 embryo transfer among in-vitro fertilization patients. *The Journal of Clinical Embryology* 12: 15 – 22.
79. **Salumets, A.**, Hydén-Granskog, Ch., Mäkinen, S., Suikkari, A. M., Tiitinen, A., Tuuri, T. (2003): Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Human Reproduction* 18: 821- 825.
80. **Salumets, A.**, Hydén-Granskog, Ch., Suikkari, A. M., Tiitinen, A., Tuuri, T. (2001): The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Human Reproduction* 16: 2177 – 2181.
81. **Sakkas, D.**, Shoukir, Y., Chardonnnes, D., Bianchi, P. G., Campana, A. (1998): Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Human Reproduction* 13: 182 – 187.
82. **Seif, M. M.**, Edi-Osagie, E. C., Farquhar, C., Hooper, L., Blake, D., McGinlay, P. (2006): Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev.* 25: 189 – 194.
83. **Sher, G.**, Keskinetepe, L., Nouriani, M., Roussev, R., Batzofin, J. (2004): Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of ‘embryo competency’ and IVF outcome. *Reproductive BioMedicine Online* 9: 74 – 78.
84. **Shoukir, Y.**, Campana, A., Farley, T., Sakkas, D. (1997): Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Human Reproduction* 12: 1531 – 1536.
85. **Schlegel, P. N.**, **Girardi, S. K.** (1997): In vitro fertilization for male factor infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 709 - 716.



- 86. Sokolová, D.** (2009): Každé dvacáté dítě v Česku se narodí po umělém oplodnění, dostupný na WWW: <<http://www.novinky.cz/zena/deti/169193-kazde-dvacate-dite-v-cesku-se-narodi-po-umelem-oplodneni.html>> [cit. 2011- 20-05]
- 87. Steinkeler, J. A.,** Woodfield, C. A., Hillstrom, M. M. (2009): Female infertility: A systematic approach to radiologic imaging and diagnosis. *RadioGraphics* 29: 1353 – 1370.
- 88. Swanson, A.,** Strawn, E., Lau, E., Bick, D. (2007): Preimplantation genetics diagnosis: Technology and Clinical Applications, *Wisconsin Medical Journal* 106: 145 - 151.
- 89. Tesarik, J., Greco, E.** (1999): The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction* 14: 1318 – 1323.
- 90.** The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2010 to Robert G. Edwards (2010), dostupný na WWW: <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2010/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2010/press.html)> [cit. 2011- 20-05]
- 91. Tvrdoňová, K.,** Pilka, L., Rumpík, D. (2005): Morfologická kvalita embryí a její vliv na úspěšnost léčby neplodného manželství, dostupné na WWW: <<http://www.gyne.cz/clanky/2005/205c11.htm>> [cit. 2011- 20-05]
- 92. Van Montfoort, A. P. A.,** Dumoulin, J. C. M., Kester, A. D. M., Evers, J. L. H. (2004): Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Human Reproduction* 19: 2103 – 2108.
- 93. Van Soom, A.,** Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D., de Kruif, A. (2002): Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. *Reprod Dom Anim* 37: 144–151.

94. **Veeck, L. L.** (1999): *An Atlas of Human gametes and Conceptuses*, Parthenon Publishing Group, 1. vydání, ISBN 1-85070-016-8
95. **Veeck et al.**, (2001): Identification of pre-embryos with hiát implantation potential: toward single blastocyst transfer. *Human Reproduction* 16: Abstract Book 1, 163.
96. **Vrbíková, J.** (2003): Syndrom polycystických ovárií. *Interní medicína pro praxi* 11: 554 – 557.
97. **Wang, J., Sauer, M. V.** (2006): In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2: 355 - 364.
98. **Wiener-Megnazi, Z., Vardi, L., Lissak, A., Shnize, S., Reznick, A. Z., Ishai, D., Lahav-Baratz, S., Shiloh, H., Koifman, M., Dirnfeld, M.** (2004): Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 82: 1171 – 1176.
99. **Wiker, S., Malter, H., Wright, G., Cohen, J.** (1990): Recognition of paternal pronuclei in human zygotes. *J. In vitro Fert. Embryo Transf.* 7: 33 – 37.
100. World Health Organization (2010): *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 5. vydání, ISBN 978 92 4 154778 9
101. **Yang, W. J., Whu, Y. M., Kuo-kuang Lee, R., Li, S. H., Fleming, S.** (2009): Early-cleavage is a reliable predictor for embryo implantation in the GnRH agonist protocols but not in the GnRH antagonist protocols. *Reproductive Biology and Endocrinology*, dostupný na WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254386>> [cit. 2011- 20-05]

- 102. Zaneveld, L. J.,** De Jonge, C. J., Anderson, R. A., Mack, S. R. (1991): Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction* 6: 1265 – 1274.
- 103. Ziebe, S.,** Petersen, K., Lindenberg, S., Andersen, A. G., Gabrielsen, A., Andersen, A. N. (1997): Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 12: 1545 – 1549.
- 104. Zhu *et al.*,** (2004): Did the exist of the mestic spindles indicate the early cleavage of the embryo? *Human Reproduction* 19: Abstract Book, 145 – 146.
- 105. Zvěřina, J.** (2010): Poruchy mužské plodnosti. *Urologie pro praxi* 11: 196 – 199.
- 106. Žáková, J.** (2011): Kontinuální sledování vývoje embryí pomocí „PrimoVision System“, dostupný na WWW: < <http://www.lekari-online.cz/lecba-neploдности/novinky/kontinualni-sledovani-vyvoje-embryi-pomoci-primovision-system>> [cit. 2011- 20-07]
- 107. Žáková, J.,** Lousová, E., Crha, I., Ventruba, P., Pohanka, M., Nentwichová, P., Pochopová, H. (2010): PICSI – selekce zralých spermií pro oplození lidských oocytů metodou ICSI. *Prakt. Gyn.* 14: 180 – 182.

**Použité obrázky dostupné na WWW:**

[www.biology.iupui.edu](http://www.biology.iupui.edu)

[www.ldysinger.com](http://www.ldysinger.com)

[www.wikipedia.cz](http://www.wikipedia.cz)

[www.darovanie.sk](http://www.darovanie.sk)

[www.babyonline.cz](http://www.babyonline.cz)

[www.utm.utoronto.ca](http://www.utm.utoronto.ca)

[www.advancedfertility.com](http://www.advancedfertility.com)

[www.topnews.ae](http://www.topnews.ae)

[www.californiaivf.com](http://www.californiaivf.com)

[www.osel.cz](http://www.osel.cz)

[www.gest.cz](http://www.gest.cz)

[www.sci.muni.cz](http://www.sci.muni.cz)

<http://vnl.xf.cz>