

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

BRNO 2016

Ing. Eva Blahová



Aspekty hodnocení kvality gamet a embryí v asistované reprodukcii

Disertační práce

Vedoucí práce:
prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.

Vypracovala:
Ing. Eva Blahová

Školitel specialista:
prof. MVDr. Miloslava Lopatářová, CSc.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: *Aspekty hodnocení kvality gamet a embryí v asistované reprodukci* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....
podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat prof. Ing. Ladislavu Máchalovi, DrSc., vedoucímu mé disertační práce za odborné vedení, cenné rady a připomínky.

Děkuji prof. MVDr. Miloslavě Lopatářové, CSc., odborné školitelce za konzultace a podporu během postgraduálního studia.

Velmi děkuji i MUDr. Janu Máchalovi, Ph.D. za pomoc při zpracování statistických dat a vyhodnocení výsledků.

Poděkování patří i Kamile Hrdličkové za jazykovou korekci mé disertační práce.

ABSTRAKT

Disertační práce je zaměřena na aspekty hodnocení kvality gamet a embryí v asistované reprodukci v návaznosti na možné souvislosti mezi vývojovou kinetikou embrya a jeho následnou schopností vyvinout se do stádia blastocysty v laboratorních podmínkách. Zároveň nalézt i spolehlivý neinvazivní marker pro výběr nejkvalitnějšího embrya s vysokým implantačním potenciálem, který by zvýšil šanci na porod dítěte pomocí asistované reprodukce. Studie byla provedena na klinice reprodukční medicíny Repro-Genesis v Brně. V práci bylo analyzováno 206 embryí, pomocí monitorovacího systému time-lapse, který umožnil záznam přesného časování klíčových událostí souvisejících s vývojem embrya. Časové parametry byly rozděleny do pěti skupin. Kvalita výsledných embryí byla rozdělena následně do čtyř kategorií v závislosti na kvalitativních parametrech. Tento systém vygeneroval embrya s vyšší mírou očekávané implantace založené na buněčném dělení embryí do stádia blastocysty. Pravděpodobnost vývoje embrya pátý den do stádia blastocysty, byla spojena s důslednou chronologií vývoje. Po vyhodnocení vztahů mezi těmito morfokinetickými parametry s následným vytvořením blastocysty, která morfologií odpovídala nejvyššímu skóre pro životaschopnost embrya, lze říci, že kinetika časného embryonálního dělení a potenciálu vývoje lidských embryí do stádia blastocysty 5. den kultivace in vitro, spolu úzce souvisejí.

Time-lapse, na základě vyhodnocení přesného načasování počátku časného dělení ve vývoji embrya, je slibným nástrojem pro predikci tvorby a kvality blastocysty, a s tím související výběr embrya s nejvyšší šancí implantace pro transfer a následný porod při léčbě pomocí asistované reprodukce.

Klíčová slova: neplodnost, kultivace embryí, blastocysta, monitoring embryí, gravidita.

ABSTRACT

The dissertation focuses on the aspects of evaluation of gamete and embryo quality in assisted reproduction in relation to possible links between the developmental kinetics of an embryo and its subsequent ability to develop into blastocyst stage in laboratory conditions. Simultaneously, the thesis also aims at finding a reliable non-invasive marker for selection of the best quality embryo with a high implantation potential, which would increase the chance of a successful childbirth as a result of assisted reproduction. The study was conducted at ReproGenesis, a clinic of reproductive medicine in Brno, Czech Republic. The thesis used time-lapse monitoring system to analyze 206 embryos which enabled the recordings of the exact timing of key events within the embryo development. The time parameters were divided into five groups. The quality of the resulting embryos was subsequently divided into four categories depending on qualitative parameters. The above described system generated embryos with a higher rate of expected implantation based on their cell division reaching blastocyst stage. The probability of an embryo developing into blastocyst stage on day 5 was linked to a strict chronology of development. Based on an evaluation of the relations between these morphokinetic parameters and a subsequent formation of blastocyst whose morphology scored the highest in terms of embryo viability, it could be concluded that the kinetics of early embryonic division and the potential of human embryo development into blastocyst stage on day 5 during an in vitro cultivation are closely related.

Time-lapse monitoring, due to its evaluation of the exact timing of the early division start during embryo development, is a promising tool for the prediction of blastocyst formation and quality and, consequently, it allows for the selection of an embryo with the highest implantation potential suitable for a transfer and the subsequent childbirth during assisted reproduction treatment.

Key words: infertility, embryo cultivation, blastocyst, embryo monitoring, gravidity.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Reprodukční systém ženy	10
3.1.1 Zevní pohlavní orgány	10
3.1.2 Děloha (uterus)	10
3.1.3 Vejcovody (tubae uterinae)	11
3.1.4 Pochva (vagina)	12
3.1.5 Pohlavní žlázy	13
3.1.6 Vývoj a zrání oocytů (oogeneze)	15
3.1.7 Menstruační cyklus	19
3.2 Reprodukční systém muže	21
3.2.1 Zevní pohlavní orgány	21
3.2.2 Vývodné pohlavní cesty	22
3.2.3 Pohlavní žlázy	24
3.2.4 Spermatogeneze a morfologie spermie	25
3.2.5 Fyziologie spermie	28
3.2.6 Morfologické metody vyšetření spermatu	30
3.3 Oplození (fertilizace)	32
3.3.1 Kapacitace spermií	32
3.3.2 Fertilizace	33
3.4 Fáze embryonálního vývoje	34
3.4.1 Celkový vývoj zárodku	45
3.4.2 Placentace a plodové obaly	50
3.5 Neplodnost	57
3.5.1 Ženská a mužská neplodnost	57
3.5.1.1 Léčba ženské neplodnosti v programu AR	58
3.5.2 Asistovaná reprodukce	60
3.5.3 Laboratorní techniky IVF	60
3.5.3.1 Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI)	64
3.5.3.2 Intracytoplazmatická injekce preselektované spermie (PICSI)	65
3.5.3.3 Asistovaný hatching (AH)	66

3.5.4 Morfokinetika jako vhodný faktor pro výběr embryí	67
3.5.4.1 Monitoring embryí	69
4 MATERIÁL A METODIKA	70
4.1 Příprava příjemkyň oocytů	71
4.2 Ovariální stimulace dárkyň oocytů	71
4.3 Punkce ovariálních folikulů	72
4.4 Denudace oocytů	72
4.5 Vyhodnocení spermioqramu a příprava spermií před metodou ICSI	73
4.6 Embryologické metody	73
4.7 Kultivace a hodnocení embryí	76
4.8 Transfer embryí	84
5 VÝSLEDKY	85
5.1 Analýza dat	85
5.2 Hodnocení sledovaného souboru	86
5.2.1 Stádium blastocysty (B), stádium blastocysty s dobrou morfologickou kvalitou (GMB) - reálné naměřené hodnoty	89
5.2.2 Stádium blastocysty (B) – srovnání reálných času s navrženým optimálním rozmezím	90
5.2.3 Stádium blastocysty s dobrou kvalitou (GMB) – srovnání času s navrženým optimálním rozmezím	94
5.2.4 Implantace embryí	98
5.2.5 Porod živého dítěte (ŽDN)	104
5.2.6 Závěrečné zhodnocení celého souboru reálných času a srovnání s navrženými optimálními rozmezími	105
5.2.7 Hodnocení embryí na základě hierarchické klasifikace	106
6 DISKUZE	108
7 ZÁVĚR	115
7.1 Uplatnění v praxi	115
8 POUŽITÁ LITERATURA	117
9 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	130
9.1 Seznam obrázků	130
9.2 Seznam tabulek	130
9.3 Seznam grafů	131

1 ÚVOD

Začlenění časosběrného snímání v oblasti in vitro fertilizace (IVF) poskytuje mnoho informací o vývoji embrya. Kombinace morfologie embrya a kinetiky probíhajících buněčných procesů, které vedou k vývoji embrya, jsou integrovány do jedinečného konceptu morfokinetika. V současné době je snaha zaměřit se na využití těchto informací s cílem zlepšit výběr embrya, stávající míru úspěšnosti a minimalizovat riziko vícečetného těhotenství. Již několik studií označilo prediktivní morfokinetiku jako slibný nástroj pro zvýšení úspěšnosti výběru životaschopných embryí a zvýšení implantačního potenciálu. Slibné doplňkové modely výběru embrya na základě časově závislých markerů již byly navrženy a jsou v současné době ověřovány v celé řadě prací. Konvenční výběr embryí je stále spojený s poměrně nízkou úspěšností v léčbě IVF. Počet těhotenství (Pregnancy rate, PR) na transfer odpovídá ~30 % (Andersen et al., 2008). Velmi často se na transfer použije více, než jedno embryo, důsledkem čehož jsou vícečetné gravidity a neonatologické komplikace předčasně narozených dětí spojené s vysokými náklady na neonatologickou péči u těchto dětí (Pinborg, 2005). Klinický výzkum se zaměřuje na nalezení neinvazivního posouzení embryí, aby bylo možné vybrat pouze jedno embryo k transferu, bez snížení šance na úspěšnou léčbu. Kontinuální sledování vývoje embryí je nejčastěji používaná metoda. Vzhled k obavě ze zhoršení podmínek kultivace a bezpečnosti vývoje embryí, je četnost pozorování a získání dostatečných informací při běžném minitoringu velmi omezená. Současná praxe v IVF laboratořích je taková, že se hodnotí následující parametry: oplození oocytů (vznik 2PN), časně dělení embrya (2 až 4-buněčné stádium), pozdní dělení embrya (6 až 8-buněčné stádium), kompaktace embrya 4. den kultivace (cca 92 hodin po oplození) a následný vývoj do stádia blastocysty (cca 120 hodin po oplození). U dělicích se embryí je hodnocen: počet blastomer, tvar a velikost blastomer, vzhled cytoplasmy, stupeň fragmentace. Dále může být sledována tloušťka zony pellucidy a přítomnost multinukleací v jednotlivých blastomerách (Palmstierna, et al. 1998; Pelinck, et al. 1998; Alikani, et al. 1999; Hardarson et al., 2001). Kvalita embryí přímo koreluje s morfologií oocytu a zygoty (vzhled cytoplasmy, postavení pronukleárů a vytvoření nefragmentovaných pólových tělísek), (Manor et al. 1999; Tesarik and Greco 1999; Ebner et al. 2000). Zavedením morfokinetického hodnocení embryí vneslo do praxe IVF laboratoří nový důležitý aspekt, který se ukazuje jako klíčový v úspěšnosti léčby neplodnosti.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo najít vhodné časové parametry v závislosti na časném dělení embryí spojené s pravděpodobností dosažení stádia blastocysty pátý den kultivace v podmínkách in vitro při využití Kontinuálního monitoringu embryí. Zjistit, zda time-lapse, poskytne dostatek informací k predikci kvalitní blastocysty a transferu embrya s nejvyšším implantačním potenciálem a porodem živého dítěte. Reálné časové proměnné srovnat s doporučenými optimálními časovými proměnnými navrženými Mese-guerem et al. (2011). A nalézt případnou shodu s navrženými hodnotami.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Reprodukční systém ženy

3.1.1 Zevní pohlavní orgány

Zevní pohlavní orgány ženy tvoří velké stydké pysky, malé stydké pysky, vestibulární žlázy a topořivé tkáně.

Velké stydké pysky (labia majora) jsou kožní řasy vyplněné tukem, které na vnitřní straně přecházejí v menší slizniční řasy malých stydkých pysků (labia minora). Velké stydké pysky jsou na zevní ploše silněji pigmentovány a od puberty pokryty chlupy přecházejícími do ochlupení nad stydkou sponou (mons pubis). Horní hranice ochlupení je u žen ostrá a ochlupení nepřechází na přední stěnu břišní. Velké a malé stydké pysky ohraničují vchod (vestibulum) do pochvy, případně uzavřený hymenem. Pod sliznicí poševního vchodu jsou uloženy malé vestibulární žlázy, zvláště hojné kolem zevního ústí močové trubice. Největší z vestibulárních žláz je tzv. Bartholiniho žláza, ležící symetricky při dolním okraji poševního vchodu. Žlázy produkují sekret zvlhčující poševní vchod. Nad poševním vchodem, několik milimetrů nad ústím močové trubice, je topořivé těleso (clitoris) odpovídající svou stavbou topořivým tělesům penisu. Po obou stranách poševního vchodu leží další topořivá tělesa kapkovitého tvaru, tvořená širokými žilními pleteněmi (Dylevský, 2011).

3.1.2 Děloha (uterus)

Děloha je silnostěnný svalový orgán hruškovitého tvaru, jehož velikost kolísá v poměrně širokém rozmezí. Je uložena pod středem dutiny malé pánve, mezi konečníkem a močovým měchýřem. Horní část dělohy je pokryta pobřišnicí a střední a dolní partie obaluje pánevní vazivo.

Děloha je v průměru 7 – 8 cm dlouhá, ve své horní části 5 – 7 cm široká a její tloušťka činí 2 – 3 cm. Děloha se skládá z děložního těla (corpus uteri), děložního dna (fundus uteri) s rohy a z krčku (cervix uteri), na který se upíná pochva. Uvnitř dělohy je šterbinovitá dutina spojená v děložních rozích s oběma vejcovody. Dutina dělohy ústí do pochvy.

Děložní stěna má tři vrstvy:

Uvnitř vystýlá dělohu sliznice (endometrium) s množstvím žlázek. Sliznice prodělává cyklické změny - menstruační cyklus, jehož smyslem je tkáňová a funkční příprava na případné přijetí oplozeného vajíčka.

Nejsilnější, střední vrstvou děložní stěny je hladká svalovina (myometrium). Děložní svalovina je upravena do spirál, vycházejících od děložních rohů a přecházející na děložní krček. Smrštěním děložní svaloviny je na konci těhotenství vypuzován plod z dělohy.

Vnější vrstvu stěny děložní tvoří vazivo (parametrium), které přechází i do okolí dělohy, kde je zahuštěno do vazivových pruhů držících dělohu ve stálé poloze. V době těhotenství, kdy děloha mnohonásobně zvětšuje svůj objem, přitahují tyto vazvy (tzv. závěsné děložní vazvy) dělohu k zadní stěně pánve a drží ji ve vzpřímené poloze. Jeden ze závěsných vazů prochází od děložních rohů tříselným kanálem a upíná se do podkožního vaziva velkých stydkých pysků. Tento vaz se napíná v konci těhotenství, kdy se přední stěna děložní již opírá o břišní stěnu (Dylevský, 2011).

3.1.3 Vejcovody (tubae uterinae)

Vejcovody jsou trubice volně zavěšené v peritoneální řase na boční stěně pánve. Vejcovody jsou dlouhé asi 13 cm. Trubice tvoří spolu s vaječníky, tzv. děložní adnexa.

Vnitřní ústí vejcovodů je volně otevřeno do břišní dutiny, která je tak u ženy spojena přes vejcovody, dělohu a pochvu s povrchem těla. Anatomická možnost tohoto spojení je za normálních okolností u dospělých žen silně omezena hlenovými zátkami, a do prvního pohlavního styku i slizniční řasou neúplně uzavírající poševní vchod - hymenem.

Vnitřní (břišní) ústí vejcovodů je opatřeno pohyblivými řasami, které se při ovulaci přikládají k povrchu vaječníku a chapadlovitě obemykají uvolněné vajíčko, které je s malým množstvím tekutiny splaveno do ústí vejcovodů. Druhý konec vejcovodů ústí do dělohy v místě tzv. děložních rohů.

Stěna vejcovodu je tvořena spirálně uspořádanou hladkou svalovinou, která svým rytmickým smršťováním posouvá vajíčko směrem od vaječníku do dělohy. Vnitřní povrch vejcovodů je pokryt sliznicí, jejíž buňky jsou opatřeny řasinkami kmitajícími směrem

do dělohy. Pohyb řasinek usnadňuje pohyb vajíčka vejcovodem. Vejcovod má především transportní funkce.

Z vaječníku uvolněné vajíčko je vejcovodem zachyceno a posunováno do dělohy. Jsou-li ve vejcovodu spermie, dojde k oplození vajíčka a vajíčko se začne ještě ve vejcovodu dělit. K oplození vajíčka a k začátku vývoje zárodku tedy dochází ve vejcovodech. Do dělohy již přichází ve stadiu několika desítek buněk. Není-li vajíčko ve vejcovodu oplozeno - zaniká a je vstřebáno buď sliznicí vejcovodu nebo dělohy (Dylevský, 2011).

3.1.4 Pochva (vagina)

Pochva spojuje děložní dutinu se zevními pohlavními orgány. Pochva je svalová trubice, která se připíná k děložnímu krčku. Poševní stěny obkružují děložní krček a vytvářejí kolem krčku tzv. poševní klenby. Mezi pochvou a stydkou sponou probíhá močová trubice. Za pochvou leží konečník. V okolí pochvy je řídké vazivo umožňující značnou roztažitelnost pochvy při porodu. Poševní sliznice je kryta vrstevnatým dlaždicovým epitelem, který v oblasti děložního čípku přechází v epitel vystylající dělohu (endometrium).

Poševní sliznice je sice bez žlázek, ale je povlečena vrstvičkou hlenu, který produkují žlázy děložního krčku. Sliznice prodělává změny, podle kterých lze stanovit fázi menstruačního cyklu děložní sliznice. Hlen spolu s oloupanými buňkami sliznice tvoří bělavý sekret, který je štěpen mikroorganismy žijícími na poševní sliznici, až na mléčnou kyselinu, která vytváří v pochvě kyselé prostředí. Kyselá reakce poševního hlenu je ochranou proti choroboplodným zárodkům, pronikajícím do pochvy přes zevní pohlavní orgány. Vchod do pochvy je uzavřen slizniční řasou, která před prvním pohlavním stykem téměř uzavírá poševní vchod. Tato řasa - panenská blána (hymen), má individuálně různou tuhost, velikost i tvar, který je daný především velikostí a tvarem otvoru, kterým v závěru menstruačního cyklu odtéká z dělohy krev se zbytky děložní sliznice. Při prvním pohlavním styku se hymen trhá a po prvním porodu celá řasa prakticky mizí (Dylevský, 2011).

3.1.5 Pohlavní žlázy

Vaječníky (ovaria)

Ovaria jsou párové pohlavní žlázy mandlovitého tvaru, umístěná po obou stranách dělohy na bočních stěnách malé pánve. Ke stěnám pánve jsou vaječníky připevněny řasou pobřišnice, která přechází i na část povrchu vaječníku. Do puberty je povrch ovaríí hladký, později je jeho povrch zbrzděn drobnými jizvičkami po uvolněných vajíčkách. Mikroskopicky se vaječníky skládají z tenkého vazivového obalu, z kůry a ze dřene.

Dřeň vaječníku tvoří vazivo, cévy a nervy vstupující do vaječníku a malé množství hladké svaloviny. Dřeň zajišťuje především látkovou výměnu vaječníku.

Kůra vaječníku je hlavní funkční částí vaječníku. V kůře jsou již při narození uložena nezralá vajíčka (oocyty). V dětství jsou oocyty v hlubších vrstvách kůry a dále se nevyvíjejí. Před narozením sice proběhne již první fáze redukčního dělení, ale nedokončí se, takže oocyty mají při narození stále diploidní počet chromosomů (46). Další fáze dozrávání vajíček pokračuje až po pubertě. Je vyvolána působením vysoké produkce hormonů adenohipofýzy - folitropinu (FSH) a lutropinu (LH), (Dylevský, 2011).

Změnám, které v dospělosti vedou k opakovanému (cyklickému) tvoření vajíček s polovičním počtem chromosomů a plně funkčními obaly, říkáme ovariální cyklus.

Ovaria produkují estrogen a progesteron, hormony odpovědné za sekundární pohlavní znaky a řízení průběhu těhotenství (Moore, 1998).

Ovariální cyklus

Cyklické změny na ovariu vyvolávají luteinizační hormon (LH) a folikulostimulační hormon (FSH). LH slouží jako „spouštěč“ ovulace (uvolnění sekundárního oocyty) a stimuluje žluté tělísko k produkci progesteronu. FSH podporuje vývoj ovariálních folikulů a produkci estrogenů ve folikulárních buňkách. Oba tyto hormony též podporují růst endometria (Moore, 1998).

Histologicky lze rozeznat ve zralém folikulu několik útvarů. Vajíčko, na povrchu s homogenním obalem – *zona pellucida*. Kolem vajíčka se řadí folikulární buňky do několika vrstev, ve kterých se tvoří dutiny vyplněné tekutinou, které později splynou v dutinu jedinou folikulární (*antrum folliculi*).

Tekutinou jsou folikulární buňky zatlačeny na periferii. Kolem vajíčka se nakupí několik vrstev granulózových buněk. Současně s kavitací se diferencuje vazivové stroma kolem folikulu. Tuto diferenciaci řídí folikulostimulační hormon (FSH), luteinizační hormon (LH) a signály z vajíčka. Vrstvu folikulárních buněk odděluje od vazivových obalů membrána (*theca folliculi*).

Zralý folikul má přes 20 mm a zráním se mění jeho poloha v kůře ovaria. Zralý folikul (Graafův folikul) se tlačí k bílé slupce (*tunica albuginea*) tvořící povrch ovaria, kterou nadzvedává. Na povrchu ovária se vytváří zřetelný hrbol.

Velikost folikulu se dá přesně změřit pomocí ultrazvukového vyšetření (folikulometrie). Ovulace nastává v pravidelném cyklu u ženy 12. až 14. den od prvního dne poslední menstruace. Po ovulaci se vajíčko dostává do vejcovodu. Po odtoku folikulární tekutiny, tlakem okolních tkání, dutina folikulu kolabuje. Z popudu FSH se na místě folikulu vytvoří proliferační stádium žlutého tělíska. Z periferie vrůstá mezi luteální buňky vazivo, krevní a mízní cévy, které se bohatě větví – stádium vaskularizační, to přechází ve stádium sekreční. Vrcholu sekreční činnosti dosahuje žluté tělísko asi 20. až 22. den cyklu, tj. asi šest dní po ovulaci. Kromě malého množství estrogenů produkuje zejména progesteron. Je-li vajíčko v době ovulace oplodněno, mění se menstruační žluté tělísko (*corpus luteum menstruationis*) v těhotenské žluté tělísko (*corpus luteum graviditatis*). Činnost žlutého tělíska v menstruačním cyklu trvá šest dní, zcela ustává za osm dní. Vytvoří se jizva, která se projeví vtažením tkáně vaječníku a vznikne bílé tělísko (*corpus albicans*) (Moore, 1998).

Ovariální cyklus má dvě fáze:

- fázi folikulární, která trvá 12 – 14 dní a zraje v ní folikul, tvořící především estrogeny (folikulární) hormony
- fázi luteální, ve které žluté tělísko produkuje hormon progesteron a malá množství estrogenů (Kobilková, 2005).

Zrání folikulu

Folikuly v kůře ovaria rostou autonomně bez stimulace hypofyzárních hormonů asi do 10 let. Ovarium v dětském věku je necitlivé na gonadotropiny, protože vazebná místa jak pro FSH, tak pro LH jsou inaktivní. Autonomně může růst primordiální folikul do stádia primárního folikulu (Trávník, 2009).

Druhou fází růstu je stimulace FSH v pubertě. Folikuly vyžívají do folikulu II. a III. řádu. V kůře ovaria je neustálý pohyb. Jedny folikuly rostou, jiné zanikají. Folikuly v kůře ovaria rostou stimulací hypofyzárních hormonů. Hypofýza má dvě části: přední lalok a zadní lalok. Přední lalok hypofýzy (*adenohypofýza*) obsahuje tři druhy buněk, které se od sebe histologicky liší: buňky bazofilní, eozinofilní a buňky chromofobní.

Bazofilní buňky jsou zdrojem látek, které řídí cyklické děje v ovariu. Produkují dva gonadotropní hormony, které jsou bílkovinné povahy, chemickým složením glykoproteiny: folikulostimulační hormon (FSH), luteinizační hormon (LH) a prolaktin (PRL), hormon luteotropní (Kobilková, 2005).

Gonadotropní hormony, FSH a LH, se tvoří pod kontrolou hypotalamických hormonů. Jsou uloženy v buňkách hypofýzy v sekrečních granulích. Granule se dostávají k buněčné membráně, přes ni do perikapilárních prostor a dále do krve. Nejsou vázány na proteinové nosiče. FSH stimuluje primordiální a primární folikul v ovariu. Účinkem se vytváří ve folikulu dutina (*antrum*). Podpoří k proliferaci folikulární buňky. Luteinizační a folikulostimulační hormon působí na folikul ovaria společně. Gonadotropiny stimuluji činnost buněk vnitřní vazivové vrstvy (*theca interna*) a buněk mezi folikuly (*intersticia*), které vytvářejí estrogény. Oba hormony se podílejí na ovulaci a na jeho změnách po ovulaci. Tyto hormony cirkulují v těle, mají však schopnost vazby jen na určité tkáně a buňky, váží se na receptory cílových tkání.

V cytoplazmě buněk ovaria se vytvoří hormon - receptorový komplex, který putuje do jádra buňky, ve kterém vyprovokuje řadu biochemických procesů. V souhře má však své místo i oocyt. Existuje určitá interakce mezi oocytem a folikulárními buňkami (Kobilková, 2005).

3.1.6 Vývoj a zrání oocytů (oogeneze)

Oogenezi nazýváme běh událostí, jimiž se primitivní zárodečná buňka zvaná oogonie transformuje ve zralý oocyt. Tento maturační proces začíná před narozením a končí dosažením pohlavní zralosti v pubertě.

Ženské pohlavní buňky vajíčka, čili *oocyty*, se vyvíjí v ovariu. Vývoj vajíček probíhá analogickým způsobem. Vývoj vajíček začíná již v období embryonálního množení kmenových buněk *oogonií* (Moore, 1998).

Prenatální a postnatální vývoj oocytů

Prenatální vývoj oocytů

V embryonálním ováriu se tvoří *oogonie*. Jejich dělení dává vzniknout oocytům I. řádu, které jsou obaleny jednou vrstvou folikulárních buněk a spolu tvoří primordiální folikul. Oocyt prvního řádu zastaví své dělení v tzv. diplotenním stádiu, což je profáze prvního zracího dělení. Když jsou homologní chromosomy odděleny, jádro vstupuje do klidového stádia. V tomto stádiu zůstávají oocyty až do zahájení puberty (Trávník, 2009).

Výskyt prvních buněk byl poprvé popsán na začátku 3. týdne vývoje embrya ve žlutkovém vaku, odkud v průběhu asi 14 dní putují cestou dorsálního mesenteria k základům pohlavních žláz.

Ještě u embryí starých 6 týdnů jsou aktivně améboidně pohyblivé a přeměňují se v *oogonie*, které jsou v této době přítomny v počtu kolem 26 000. Jejich množství vzroste na asi 250 000 v 9. týdnu vývoje plodu, kdy cestují nediferencované buňky do kůry vyvíjejícího se ovaria (Trávník, 2009).

Ve 12. týdnu tvoří *oogonie* skupiny synchronních mitóz. Vzniku oocytů tedy předchází vlna proliferace *oogonií*, která automaticky přechází do profáze meiózy. Liší se od ostatních mitóz rytmickým průběhem a silnou synchronizací. *Oogonie* zůstávají spojeny cytoplazmatickými můstky. Po ukončení proliferační fáze, proběhne v oocytech poslední, premeiotická S-fáze. Ve 13. týdnu jsou v kůře početné oocyty, které vstoupily do profáze meiózy.

Na počátku 5. měsíce se v kůře vytváří zóna obsahující skupiny oocytů, které vstoupily do tvorby folikulů. Meióza se přerušuje v diplotenní fázi, kdy jsou homologní chromosomy odděleny a jen v místech s chiasmaty zůstávají spojeny. Jádro vstupuje do klidového stadia a oocyt zformuje, spolu s folikulárními buňkami po ukončení diplotenního stadia, primordiální folikul.

Mezi 6. - 7. měsícem vývoje je primordiálními folikuly rovnoměrně obsazena celá kůra. Během proliferace *oogonií* a *leptotenního* a *pachytenního* stadia dochází k úbytku pohlavních buněk, jen část se stává součástí folikulů. K dalšímu poklesu počtu dochází do porodu, kdy zůstávají 1 až 2 miliony primordiálních folikulů (Trávník, 2009).

Postnatální vývoj oocytů

Postnatálně, ještě před zahájením puberty, folikuly s oocyty zanikají a při dosažení pohlavní zralosti se jejich počet pohybuje okolo 200 000 v každém ováriu.

Folikulogeneze patří do postnatální fáze vývoje oocyty. Je založena na proliferaci buněk a cytodiferenciaci. Jde u ženy o dlouhý proces, který potřebuje asi jeden rok, aby se primordiální folikul vyvinul do ovulačního stadia (Trávník, 2009).

Zrání a morfologie oocyty

Zrání oocyty (meioza)

Meioza zajišťuje konstantní počet chromosomů a je důležitou součástí zrání oocyty. Je důležitým zdrojem diverzity genomu. Mezi meiotickými děleními již nedochází k S-fázi (chybí syntéza DNA) a jejím výsledkem jsou 4 buňky s haploidním počtem (u člověka 23) chromosomů, každá z nich obsahuje bezprostředně po ukončení meiózy II 1n množství DNA. Je to způsob dělení, při němž probíhá meiotické dělení – *meioza I a meioza II* (Trávník, 2009).

Meioza I

Profáze I

Během profáze se homologní chromosomy párují a za účasti kohesinů formují synaptonemální komplexy, které spojují sesterské (pocházející od téhož rodiče) chromatidy, zatímco nesesterské chromatidy vytvářejí *chiasmata*.

Párované chromosomy se nazývají *bivalenty*, každý obsahuje jeden chromosom otcovského a jeden mateřského původu a je složen ze čtyř chromatid (tetráda).

Profáze I probíhá ve čtyřech fázích:

- *Leptotene* = dochází ke kondenzaci chromozomů a jejich párování.
- *Zygotene* = formuje se synaptonemální komplex.
- *Pachytene* = je ukončena synapse, objevují se rekombinační uzlíky, jeden nebo několik, reprezentující body crossing over. Obsahují enzymy potřebné pro rekombinaci a opravu DNA.
- *Diplotene* = rekombinace DNA je hotová, synaptonemální komplex se začíná rozvolňovat.

Prometafáze I

Mizí jaderný obal, formují se kinetochory a připojují chromosomy k mikrotubulům dělicího vřeténka tak, aby se obě sesterské chromatidy dostaly k jednomu pólu.

Metafáze I

Bivalenty, každý složený ze dvou chromosomů (čtyř chromatid) vytvářejí metafázovou ploténku. Jejich orientace vzhledem k pólům dělicího vřeténka je náhodná, takže pravděpodobnost, že otcovský nebo mateřský chromosom přejde do jedné nebo druhé budoucí buňky je stejná.

Anafáze I

Kohesiny uvolní chiasmata, chiasmata se oddělí, chromosomy (každý složený ze dvou sesterských chromatid – avšak změněných v důsledku *crossing over*) se pohybují k opačným pólům.

Telofáze I

Pokud jde o meiózu v průběhu spermatogenezy, zformuje se jaderný obal, u oogeneze přechází rovnou do meiózy II.

Cytokinéza

Je podobná mitóze, při spermatogeneze se vytvoří dvě rovnocenné buňky, při oogeneze oocyt II řádu a 1. pólocyt.

Výsledkem meiózy I jsou dvě buňky s haploidním počtem chromosomů. Každý chromosom obsahuje dvě chromatidy. Chromatidy nejsou rovnocenné, protože došlo k výměně částí chromatid při *crossing over* (Trávník, 2009).

Meióza II

Cytokinéza není následována S-fází a následuje meióza II, která má obdobné fáze jako mitóza. V anafázi II se oddělí sesterské chromatidy a jako samostatné chromosomy putují v telofázi k opačným pólům dělicího vřeténka. Při meióze II vznikají z každé buňky dvě haploidní dceřiné, v nichž každý chromosom je složen z jedné chromatidy (obsah DNA je $1n$).

Během *preantrální* periody vzroste průměr primárního folikulu z 25 na 120 μm , což souvisí s reaktivací genomu oocyty. Jsou aktivovány geny pro proteiny *zona pellucida*. Tyto proteiny začínají vytvářet na povrchu oocyty zonu. Vytvářejí se spojení (*gap junctions*) mezi oocytem a folikulárními buňkami.

Pík LH (luteinizační hormon) vyvolá 1. zrací dělení – výsledkem je oocyt v metafázi II. Po oplození dojde k dokončení meiózy II.

Po dokončení meiózy II a po oplození oocytu spermií, dochází k dělení (rýhování) embrya. Nastává mitóza buněk - normální buněčné dělení (Trávník, 2009).

3.1.7 Menstruační cyklus

Zároveň se změnami, ke kterým dochází ve vaječniku v průběhu ovulačního cyklu, se mění stavba a funkční stav děložní sliznice. Opakujícím se změnám, které sliznice prodělává, říkáme menstruační cyklus. Změny, kterými sliznice prochází, jsou vyvolány vaječnickovými hormony – estrogenem a progesteronem.

Menstruační fázi, tj. odloučením a odstraněním zničené sliznice, začíná každý menstruační cyklus. Začátek krvácení je prvním dnem, od kterého počítáme trvání jednotlivých období. Menstruační fáze cyklu trvá asi čtyři dny.

Proliferační fáze (růstová) navazuje na ukončené menstruační krvácení, při kterém byla děložní sliznice odloučena od děložní stěny a odplavena. V proliferační fázi především roste nová děložní sliznice vystylající děložní dutinu. Sliznice je silně prokrvena a obnovují se i žlázy potrhané při odlučování sliznice. Tuto fázi cyklu řídí estrogeny, tvořící se v dozrávajícím Graafově folikulu. Růstové období sliznice trvá asi týden a spadá do údobí mezi 5. - 12. dnem cyklu.

Sekreční fáze plynule navazuje na období proliferace. Sliznice se dále zvyšuje (dosahuje síly až 5 mm) a rostou zvláště žlázy, které produkují velké množství hlenu. Sliznice je výborně prokrvená. Změny v této fázi cyklu vyvolává především progesteron vytvářený v žlutém tělísku. Celé sekreční období trvá od 12. do 27. dne cyklu. Děložní sliznice je v sekreční fázi připravena přijmout vajíčko resp. zárodek, který - dojde-li k oplození, přichází v tomto období z vejcovodu do dělohy. Vajíčko se z vaječniku uvolňuje asi mezi 12. - 14. dnem cyklu, tj. ve vrcholu tzv. ovulačního cyklu. Vrchol ovulačního cyklu (ovulace vajíčka) spadá tedy asi do poloviny menstruačního cyklu, tj. do období, kdy je sliznice dělohy nejlépe připravena přijmout oplozené vajíčko. Jestliže nedojde k oplození, zaniká žluté tělísko vytvořené po ovulaci a klesá i produkce progesteronu, který je pro udržení sliznice v sekreční fázi nezbytný. Poklesne-li jeho množství, začíná se děložní sliznice snižovat a mezi 24. - 27. dnem se postupně rozpadá.

Ischemická fáze je velmi krátká. Trvá asi 24 hodin a dostavuje se 27. - 28. den menstruačního cyklu. Náhlý pokles progesteronu a uvolnění oxytocinu ze zadního laloku mozkového podvěsku, vyvolává několikahodinové křečovitě stažení cév zásobujících sliznici a nedostatečně prokrvené endometrium se rozpadne. Sevření cév povoluje a krev přitékající do poškozené sliznice odlučuje odumřelé vrstvy a odplavuje cary sliznice z děložní dutiny. Začíná nový cyklus.

Popsaný časový průběh menstruačního cyklu je příkladem pravidelného, osmadvacetidenního cyklu dospělé ženy. Od popsaného schématu existuje množství odchylek. Řada cyklů je delších nebo kratších a přitom nemusí jít o chorobný stav. Běžné je kolísání menstruačního cyklu v rozmezí 24 - 32 dnů jeho celkové délky. Větší odchylky jsou již obvykle poruchou, která je často spojená i s poruchou plodnosti.

Význam nemá pouze celkové trvání cyklu, ale i délka a poměr délek jednotlivých fází cyklu, a jejich časový vztah k ovulačnímu (vaječnickovému) cyklu. Zkrátí-li se, nebo časově posune např. sekreční fáze, dojde k ovulaci příliš brzy nebo příliš pozdě. I když pak dojde k oplození vajíčka, dělicí se vajíčko přijde do nevhodného prostředí nedostatečně silné nebo do méně prokrvené sliznice, a rozpadá se. Při časovém posunu jednotlivých fází cyklu je doba trvání funkčně výhodného stavu sliznice příliš krátká pro úspěšné uchycení zárodku.

Menstruační cyklus je přípravou děložní sliznice na přijetí oplozeného vajíčka. Není-li vajíčko oplozeno, cyklus se opakuje. Dojde-li k oplození, zůstává menstruační cyklus zastaven v sekreční fázi po celou dobu těhotenství.

Žluté tělísko si v těhotenství udržuje svou funkci a pokračuje v produkci progesteronu. Účinkem progesteronu přetrvává sekreční fáze, která je pro další vývoj zárodku nejvýhodnější. Asi od druhé třetiny těhotenství postupně přebírá funkci žlutého tělíska placenta, která svou produkcí progesteronu udrží sekreční fázi endometria až do porodu (Dylevský, 2011).

3.2 Reprodukční systém muže

3.2.1 Zevní pohlavní orgány

Zevní pohlavní orgány tvoří pyj a šourek, ve kterém jsou uložena varlata.

Pyj (penis) je kopulační orgán, v ochablém stavu dlouhý asi 12 - 14 cm. Při napřímení se asi o 5 cm prodlužuje. Pyj je složen z jednoho nepárového a jednoho párového topořivého tělesa. Močová trubice prochází nepárovým topořivým tělesem. Na povrchu penisu je kůže. Topořivá tělesa (corpora cavernosa) jsou z tkáně houbovitého vzhledu s bohatým cévním zásobením. Naplní-li se drobné dutinky topořivých těles větším množstvím krve, napíná se povrchový vazivový obal těles a dojde k napřímení penisu – k erekci.

Erekce je složitý reflexní děj, ovládaný autonomním nervstvem z tzv. erekčního centra v bederní míše. Napřímení penisu, které je nezbytné k uskutečnění pohlavního spojení, je vyvoláno buď mechanickým drážděním kožních receptorů zevních pohlavních orgánů, nebo může být navozeno i odpovídajícími psychickými podněty. Pominou-li vlivy, které erekci vyvolaly, nebo dojde-li k ejakulaci, erekce postupně ochabuje. Rozšířením odvodných cév se zvýší odtok krve z topořivých těles a klesne i tlak krve v houbových tkáních. Kromě topořivých těles orientovaných rovnoběžně s uretrou, je kolem zevního ústí močové trubice houbovitá hmota límcovitého tvaru - žalud (glans penis). Penis je kryt kůží, která v oblasti žaludu tvoří volně posunlivý kožní límec - předkožku (praeputium). Kůže penisu přechází při kořeni pyje do kůže šourku a kůže přední břišní stěny.

Šourek (scrotum) je vak, jehož stěnu tvoří ochlupená kůže s vrstvičkou hladké svaloviny a obaly varlete. Šourek je uvnitř rozdělen na dva samostatné prostory, ve kterých leží pravé a levé varle s nadvarlaty a začátky obou chámovodů. V šourku uložená varlata mají nižší teplotu, než je teplota těla. Od puberty je kůže šourku ochlupena. Ochlupeň přechází na kůži tukového polštáře nad stydkou sponou (mons pubis) a plynule pokračuje do ochlupení kůže na přední ploše břicha (Dylevský, 2011).

3.2.2 Vývodné pohlavní cesty

Semenotvorné kanálky se na zadním okraji varlete spojují a přecházejí do kanálku nadvarlete.

Nadvarle (epididymis) leží na horní a zadní ploše varlete. Dozrívající pohlavní buňky se v kanálku nadvarlete mísí s hlenovitým sekretem buněk vystylajících kanálek. Spermie jsou v nadvarleti nejen shromažďovány, ale získávají zde i schopnost samostatného pohybu a sekret nadvarlete má význam pro jejich látkovou výměnu. Zralé spermie si v nadvarleti udržují plnou funkční zdatnost tj. asi 40 dnů.

Vývodem nadvarlete je chámovod, spojující nadvarle s močovou trubicí.

Chámovod (ductus deferens) je trubice dlouhá asi 40 cm. Probíhá od nadvarlete šourkem do zevního ústí tříselného kanálu a prochází kanálem do břišní dutiny, kde se zatáčí do pánve a vyústí pod močovým měchýřem do močové trubice, která zde prochází prostatou. Ve stěně chámovodu je množství spirálně upravené hladké svaloviny, která svým smrštěním při pohlavním dráždění nasává a vystřikuje spermie z nadvarlete do močové trubice. Před vyústěním do močové trubice prochází chámovod předstojnou žlázou, kde do něho ústí vývody měchýřkovitých žláz.

Měchýřkovité žlázy (vesiculae seminales) jsou uloženy na zadní a spodní straně močového měchýře. Jsou obvykle párové. Krátké vývody měchýřkovitých žláz se spojují s koncovým úsekem ductus deferens a společně ústí do močové trubice. Žlázy produkují sekret, který zvyšuje pohyblivost spermií a zajišťuje i jejich výživu.

Předstojná žláza (prostata) je uložena pod dnem močového měchýře na svalovém dnu pánve. Má velikost kaštanu. Středem prostaty prochází močová trubice, do které zde ústí chámovody a měchýřkovité žlázy. Prostata má na svém povrchu vazivové pouzdro, od kterého odstupují přepážky rozdělující předstojnou žlázu na jednotlivé laloky. Prostata je svalový a žlázový orgán. Mezi žlázami prostaty jsou roztroušeny buňky hladké svaloviny a vazivové buňky. Prostatické žlázy produkují řídký a mléčně zakalený sekret. Dojde-li při pohlavním dráždění k rytmickému smršťování svaloviny chámovodu a k vypuzování spermií z nadvarlete, smršťují se i buňky hladkého svalstva ve stěně měchýřkovitých žlázek a v pouzdru prostaty.

Obsah prostaty a měchýřkovitých žlázek je pak vyprazdňován do močové trubice, kde se smíchá se spermiemi a s hlenovitým sekretem nadvarlete. Vzniklá tekutina se nazývá ejakulát (Dylevský, 2011).

Ejakulát (chám) má poměrně složitou stavbu. Základní význam mají zásadité látky obsažené v sekretu prostaty a v sekretu měchýřkovitých žláz. Kyselé poševní prostředí totiž omezuje pohyb spermií a zásadité látky v ejakulátu neutralizují kyseliny a usnadňují pronikání spermií do dělohy. Množství ejakulátu se pohybuje od 2 do 4 mililitrů. Každý mililitr obsahuje i více než 120 milionů spermií, tzn., že při pohlavním styku je uvolněno z nadvarlete asi 300 - 400 milionů pohlavních buněk. Klesne-li množství spermií pod 80 milionů v celé dávce ejakulátu, je muž méně plodný; při poklesu pod 20 - 30 milionů je prakticky neplodný. (Záleží ovšem i na "kvalitě" spermií. Mnoho spermií je i u zdravého a zcela plodného muže různě poškozeno. Současná andrologie udává pro naši populaci výrazně nižší hodnoty. Za plodného se považuje muž s celkovým počtem nepoškozených spermií mezi 20 - 30 miliony.) Přitom k oplodnění vajíčka stačí jediná spermie. Tento zdánlivý paradox vyplývá mj. z nutnosti, aby pro oplození byl k dispozici velký počet spermií, které produkují enzymy nutné k průchodu spermií hlenovými zátkami dělohy, a k vniknutí hlavičky a středního oddílu spermie do vajíčka. (Bičík je odhozen.) Teprve obrovský počet buněk vytváří dostatečné množství enzymů, nezbytných pro průnik jediné spermie.

Mužská močová trubice (urethra) vystupuje ze dna močového měchýře. Probíhá prostatou a po průchodu svalovým pánevním dnem vstupuje do pohlavního údu. Ve stěně močové trubice jsou uloženy drobné žlázy produkující hlen, který chrání povrch sliznice. V úseku od prostaty k zevnímu ústí trubice na konci pohlavního údu, je močová trubice společnou vývodnou cestou močových i pohlavních orgánů.

Na močové trubici jsou dva kruhové svěrače, kterými je ovládána mikce a vyprazdňování vývodných pohlavních cest. Vnitřní svěrač je vytvořen ze svaloviny dna měchýře. Není ovládán vůlí a se vzrůstajícím tlakem v měchýři se při mikci první uvolňuje. Zevní svěrač je v místech, kde močová trubice prochází svalovým dnem pánve. Tímto svěračem je vůlí řízeno vyprazdňování močového měchýře. Při vyvrcholení pohlavního styku dochází k opakovaným kontrakcím hladké svaloviny vývodných pohlavních cest - chámovodů, stěny měchýřkovitých žlázek a pouzdra prostaty. Vnitřní svěrač močové trubice se ale uzavírá a spermie tak nemohou pronikat do močového měchýře.

Ejakulát je proto vypuzován do močové trubice a při otevřeném zevním svěrači je vystřikován z jejího zevního ústí. Průběh mikce i vyprazdňování pohlavních cest je řízeno složitou souhrou reflexů, které zprostředkují míšní nervy a řídicí centra v hrudní a bederní páteři (Dylevský, 2011).

3.2.3 Pohlavní žlázy

Mužskými pohlavními žlázami jsou varlata. Varlata produkují pohlavní buňky (spermie) a pohlavní hormony (testosteron).

Varlata (testes) jsou párové vejčité orgány dlouhé 4 - 5 cm a široké 2 - 3 cm. U dospělého muže jsou uložena v šourku, mimo břišní dutinu. Varlata obaluje silné vazivové pouzdro, od kterého odstupují přepážky, rozdělující vnitřní prostor varlete na několik oddílů. V jednotlivých oddílech varlete jsou mnohonásobně stočené semenotvorné kanálky. Kanálky se při zadním okraji varlete spojují a společně ústí do kanálku nadvarlete. Nadvarle je prvním úsekem vývodných pohlavních cest.

Semenotvorné kanálky mají ve stěně dva typy buněk: semenné pohlavní buňky a Sertoliho buňky. Ve vazivu mezi kanálky leží Leydigovy buňky produkující pohlavní hormony.

Semenné buňky - spermie, procházejí dlouhým a komplikovaným vývojem, v jehož průběhu se z nezralé pohlavní buňky vyvíjí zralá spermie. Postupný vývoj spermií - spermatogeneze, začíná v době pohlavního dospívání a trvá až do individuálně různého vysokého věku.

Nezralé pohlavní buňky tvoří dvě až tři vrstvy buněk na vnitřním povrchu stěny semenotvorných kanálků. Před pubertou jsou spermatogonie v kanálkách jediným typem zárodečných buněk. Na počátku puberty (12 - 14 let) se v adenohipofýze prudce zvyšuje produkce lutropinu a jeho působením začínají pohlavní buňky dozrávat. Zralé spermie jsou mírným tlakem uvnitř semenotvorných kanálků vytlačovány do nadvarlete. V nadvarleti se dokončuje zrací proces.

Pro normální průběh tvorby spermií je nezbytná přesná regulace teploty ve varleti. Spermie dozrávají pouze při teplotě asi o 4 stupně C nižší, než je teplota v břišní dutině. Vhodná teplota pro tvorbu spermií je řízena dvojitým mechanismem:

Varle má bohaté cévní zásobení. Tepny přivádějící pro varlata krev z břišní aorty probíhají v semenném provazci v těsné blízkosti odvodných žil. Teplejší tepenná krev je ochlazována odtékající žilní krví. Úprava cév varlete v principu odpovídá "protiproudovému tepelnému výměníku", jaký se užívá v technice.

Varlata jsou uložena mimo břišní dutinu v šourku. Ve stěně šourku i v obalech varlete jsou svalové snopce, které svým smrštěním přitahují varlata k zevnímu ústí tříselného kanálu, nebo je uvolněním oddalují od břišní dutiny. Přitažením se teplota ve varleti zvyšuje, ochabnutím svaloviny je varle ochlazováno (Dylevský, 2011).

3.2.4 Spermatogeneze a morfologie spermie

Spermatogeneze

Vývoj mužských pohlavních buněk - spermií, začíná v pubertě a pokračuje celý život, přičemž kvalita spermií může být ve vyšším věku muže zhoršena. Spermie se vyvíjí v semenotvorných kanálcích varlete z kmenových buněk spermiogonií.

V pubertě se začínají kmenové spermiogonie, ležící na samé periférii kanálků, mitoticky množit. Mitózami kmenových spermiogonií vznikají jednak další kmenové buňky s dlouhým buněčným cyklem, které doplňují populaci kmenových spermiogonií, jednak spermiogonie, které zůstávají v průběhu mitózy spojeny mezibuněčnými můstky zvané spermiogonie typu A. Spermiogonie typu A mají krátký buněčný cyklus, rychle se opakovaně mitoticky dělí v několik populací (klonů), které se liší od kmenových buněk strukturou jádra. Buňky poslední populace (klonu) spermiogonií A se z bazálních partií kanálků posunují směrem k luminu a vstupují jako spermiogonie typu B do prostorů vytvořených spojením výběžků Sertoliho buněk. Spermiogonie B v kontaktu se Sertoliho buňkami se přestávají mitoticky dělit a vstupují do profáze meiózy, během níž se zvětšují ve velké buňky spermiocyty (Vacek, 2006).

Sertoliho buňky jsou mezi sebou spojeny zvláštním typem mezibuněčných těsných kontaktů, specifických pro tyto buňky. Specifické typy mezibuněčných těsných kontaktů Sertoliho buněk tvoří bariéru mezi vyvíjejícími se pohlavními buňkami a intersticiálním prostorem, bariéru krev - pohlavní buňky. Vzhledem k přítomnosti této bariéry nemo-

hou pronikat proteiny produkované vyvíjejícími se pohlavními buňkami do intersticiálního prostoru, odtud do krve a indukovat tvorbu protilátek proti pohlavním buňkám. Porušení bariéry může být příčinou neplodnosti antigenní povahy.

Stádium spermiocytů zahrnuje profázi I. zracího dělení. Tímto dělením vzniká další generace buněk zvaných prespermatidy, které již mají haploidní počet chromozomů (23). Po prvním zracím dělení následuje, po krátké pauze bez interfáze a bez replikace chromozomů, II. zrací dělení, kterým se prespermatidy rozdělí v malé buňky spermatidy, jejichž jádra mají haploidní počet jednoduchých chromozomů a poloviční obsah DNA.

Spermatidy zůstávají uloženy na okraji lumina semenoplodných kanálků v záhybech Sertoliho buněk a přeměňují se v bičíkovité buňky spermie. Z jádra spermatidy vznikne hlavička spermie, buněčná organela (dvojice centriolů a mitochondrie) vytvoří krček a bičík, kterým se spermie pohybuje. Největší z váčků Golgiho komplexu se přesune na jádro a jako akrozomální váček povlékne přední dvě třetiny hlavičky spermie.

Po dokončení přeměny spermatidy ve spermii se spermie uvolňují z vzájemného spojení odškracením většiny cytoplazmy v podobě reziduálních tělísek a vstupují do lumina kanálků. Jeden cyklus určitého vývojového stádia trvá přibližně 16 dnů. Vývoj zralé spermie zahrnuje čtyři cykly, tj. přibližně 64 dní.

Na spermiogenezi působí hypofyzární folikulostimulační hormon (FSH) a androgeny. Nejvýznamnější z androgenů je testosteron, který vylučují ve varleti Leydigovy intersticiální buňky. Činnost intersticiálních buněk stimuluje hypofyzární luteinizační hormon (LH). Působení LH na intersticiální buňky je podmíněno přítomností specifického receptoru.

Testosteron je nezbytný pro přeměnu spermiocytů v prespermatidy a jejich další vývoj. Působení testosteronu na spermiogenezi zprostředkují Sertoliho buňky, které obalují svými záhyby a výběžky vyvíjející se pohlavní buňky. Na přeměnu spermatid ve spermie působí FSH. Pod vlivem FSH se v Sertoliho buňkách tvoří specifický protein, vázající androgeny (ABP), který konjuguje s testosteronem a je vylučován do lumina semenotvorných kanálků (Vacek, 2006).

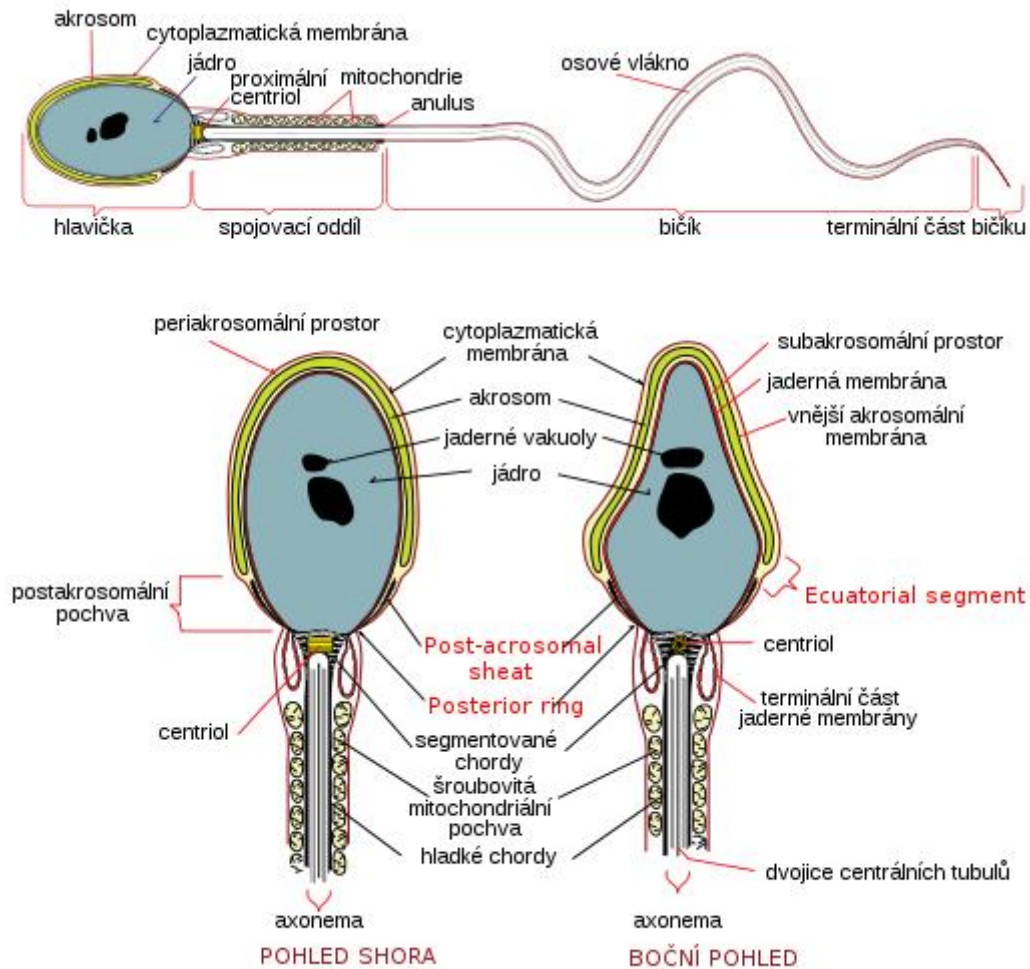
Morfologie spermie

Spermie tvoří nejdůležitější složku ejakulátu. Jejich velikost a tvar jsou druhově rozdílné a společným hlavním znakem je pohyblivost a schopnost oplození (Jelínek, 2003).

Lidská spermie je 50 - 60 μm dlouhá buňka, 40 - 50 μm z toho připadá na bičík. Skládá se z hlavičky a z bičíku. Na celém povrchu je spermie pokryta buněčnou membránou. Apikální část hlavičky spermie je zřepu nazad oploštělá, oválného tvaru, při pohledu ze strany hruškovitá. Hlavička spermie obsahuje genetickou výbavu spermie. Pod buněčnou membránou na hlavičce spermie je uložen akrozomální váček (akrozom). Obsahuje enzymy uplatňující se při oplození (Vacek, 2006).

Na povrchu buněčné membrány jsou vázány proteiny a glykoproteiny antigenní povahy, které mají významnou úlohu pro oplozující schopnost spermie. Stabilizují buněčnou membránu nad akrozomálním váčkem a zabraňují předčasnému uvolnění enzymů z akrozomálního váčku, chrání spermie před fagocytózou buňkami ženských pohlavních orgánů a zabraňují shlukování spermií v ejakulátu (Vacek, 2006).

Bičík spermie představuje pohybové ústrojí spermie. Je spojen s hlavičkou krčkem. Bičík je tvořen spojovacím oddílem, středním oddílem a koncovým (terminálním) oddílem. Střední oddíl spermie je složen z krčku a z tzv. spojovacího oddílu. Spojovací oddíl plní úlohu energetického centra spermie. Jsou v něm nahromaděny mitochondrie zabezpečující energetickou bilanci oxidačními fosforylacemi pro funkci spermie. Na aktivitě mitochondriálních enzymů spermie závisí pohyblivost spermií – motilita (Jelínek, 2003).



Obr. 1: Morfologická stavba spermie (zdroj: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spermie>)

Morfologická stavba spermie je jeden z nejdůležitějších parametrů, který se hodnotí před léčbou IVF. A je hlavním kritériem při výběru vhodné spermie použité u metody ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie do cytoplazmy oocyty).

3.2.5 Fyziologie spermie

Normální spermie jsou schopny se ve vhodném tekutém prostředí pohybovat rychlostí 1 až 4 mm/min, přičemž se pohybují po rovné, rotující linii. Schopnost spermie oplodnit oocyt za přirozených podmínek nebo při oplození *in vitro* úzce koreluje s rychlostí a přímočarostí jejich pohybu. Aktivní pohyb spermie zajišťuje jednak její přemísťování,

jednak je nezbytný pro průnik přes *zona pellucida*. Aktivita spermií je stimulována mírně alkalickým prostředím. Aktivita spermie vzrůstá při zvyšování teploty, zvyšuje se však zároveň i metabolismus a zkracuje životnost spermií.

Spermie nenesou žádné zásobní látky, jsou vyživovány difúzí z okolí. Zdrojem energie pro pohyb a další funkce spermií je ATP (adenozintrifosfát), který vzniká v mitochondriální pochvě. energii získává lidská spermie převážně glykolýzou, důležitou alternativní metabolickou cestou je pentózový cyklus.

Pro normální funkci spermií jsou potřebné zejména draslík, vápník, hořčík a zinek. Koncentrace zinku v lidských spermiích je vyšší než v kterékoliv jiné buňce. Spermie mají omezenou životaschopnost, neprobíhá v nich syntéza nukleových kyselin. Na povrchu spermie jsou vazná místa pro připojení k druhově specifickým molekulám na povrchu *zona pellucida*.

Stavba těla spermie je přizpůsobena jednak pohybu, jednak průniku obaly vajíčka. Vynutá spermie musí být schopna aktivně projít zátokou cervikálního hlenu, vycestovat děložní dutinou do vejcovodu, projít kumulárními buňkami obklopující vajíčko, navázat se na receptory *zona pellucida*, proniknout přes ní do perivitellního prostoru, navázat se se svým ekvatoriálním segmentem na *oolemu* a proniknout do vajíčka (Trávník a Čech, 2011).

Aktuální WHO manuál uvádí minimální hodnoty jednotlivých parametrů, při kterých je možné očekávat úspěšné oplození přirozenou cestou:

Objem spermatu: 1,5 (1,4 – 1,7) ml

Celkový počet spermií v ejakulátu: 39 (33 – 46) milionů

Koncentrace spermií: 15 (12 – 16) milionů/ml

Celková pohyblivost spermií: 40 (38 – 42) %

Progresivní pohyblivost spermií: 32 (31 – 34) %

Vitalita spermií: 58 (55 – 63) %

Morfologie spermií: 4 (3 – 4) %

3.2.6 Morfologické metody vyšetření spermatu

Poznatky o morfologii spermií a o morfologických abnormalitách mohou přispět ke zjištění příčin neplodnosti mužů. Využívá se při tom zdokonalené mikroskopické techniky a různých způsobů barvení. Laboratornímu, morfologickému a cytochemickému vyšetření musí být podrobena sperma čerstvé. Všechny pomůcky, které přijdou do styku se spermatem, musí být sterilní, chemické čisté. Roztok k naředění ejakulátu nesmí vyvolat sekundární změny.

Při vzniku vadných spermií se uplatňuje řada vlivů genetických a negenetických (fyziálně -chemických, vliv výživy, toxicko - infekčních, vliv věku a další), (Louda, 2001).

Podle místa vzniku se změny spermií rozdělují na primární a sekundární:

Primární změny spermií

Tyto vady vznikají v průběhu spermatogenního cyklu. Patří sem degenerativní formy spermií, změny tvaru hlavičky, změny v nukleoplazmě, změny na akrozómu, tvarové změny bičíku a další vývojové anomálie (Louda, 2001).

Sekundární změny spermií

Tyto změny nastávají při dlouhém pobytu spermií v ocasu nadvarlete, dále v průběhu ejakulace, špatnou manipulací s odebraným spermatem, nesprávné přípravě preparátů. Tyto změny jsou projevem kvalitativních změn v semenné plazmě a nesprávného technologického postupu při zpracování spermatu. Patří sem změny hlavičky, změny akrozómu, torze bičíku (Louda, 2001).

Při posuzování morfologických změn na spermiích rozdělujeme patologické formy spermií do následujících skupin:

Vývojové tvarové anomálie degenerativního charakteru

Počítáme všechny formy spermií, které se vyvinuly atypicky a nemají normální diferenciace, hlavičku s akrozómem, spojovací část bičíku a bičík samotný. Nejčastěji jde o atypický tvar hlaviček. Řadíme sem i takové spermie, u nichž se nevytvořil normální bičík, ale místo bičíku pouze vakovitý nebo kyjovitý útvar, dále spermie s dvojitým

bičíkem nebo se zdvojenou hlavičkou a jiné. Vyšší procento takto utvářených spermií je ukazatelem vážnější poruchy spermatogeneze.

Patologické formy ve tvaru hlaviček

Změny jsou nejčastějšími odchylkami při poruchách spermiogeneze a provázejí nejčastěji vznik generativních nebo zánětlivých procesů ve varlatech. Nejčastěji se vyskytují hlavičky zúžené, hruškovité, abnormálně velké, asymetrické, ovoidní, oválné, dále spermie s abnormální strukturou hlavičky, která může být proláklá, plošná, příliš široká nebo s úzkým klenutím. Všechny tyto změny patří mezi změny primární.

Změny na akrozómu

Nejčastější anomálií je akrozóm zbobtnalý. K této změně dochází i při manipulaci se spermatem. Akrozóm obvykle praskne a akrozómová hmota se vylíje do prostředí. Mezi další změny vnitřní struktury akrozómu patří kondenzace akrozómové hmoty k přednímu okraji hlavičky, zřasení předních okrajů hlaviček, různé granulace v akrozómové substanci a jiné, které bývají obvykle sekundárního charakteru.

Změny v zadní části hlavičky

Jde převážně o změny v nerovné tinktorické schopnosti kalíšku nebo výskyt různých granulačních tělísek.

Změny na spojovací části

Rozpoznání těchto změn vyžaduje již poměrně značné zkušenosti a citlivost oka, aby byly zachyceny jemné změny, mezi které patří hlavně zkrácení spojovací části, jejich prodloužení, ztlustění, zúžení, přerušování spojovací části v některém úseku, ve kterém probíhá pouze holé osově vlákno, nebo rozvázání mitochondriální spirály, která se jeví jako vinoucí se nitkový závit.

Patologické změny na bičících

Nejčastěji se jedná o stočení bičíku kolem protoplazmatické kapky, obvykle na konci spojovací části bičíku. Může to být stočení bičíku do tvaru houslového klíče, zavinutí bičíku do klubka. Řadíme sem i tzv. Dag-defekt. Tato anomálie je popisována jako změna s dědičnou predispozicí. Dále sem patří abaxiální upevnění bičíku, kdy bičík nevychází ze středu, ale z okraje hlavičky.

Nezralé spermie

Jedná se o spermie se zadrženu protoplazmatickou kapkou na krčku - proximální, nebo v průběhu spojovací části - distální. Při vyšším výskytu nezralých spermií v ejakulátu je třeba sledovat výskyt dalších vývojových vad.

Změny v nukleoplazmě

Tyto změny se posuzují při použití speciálního barvení, znázorňujícího jadernou substanci. Mezi nejčastější změny patří miliární vakuoly při předním okraji hlavičky, makrovakuoly, nepravidelné uspořádání DNA v jádře, nebo slabá barevná reakce nukleoplazmy (Louda, 2001).

3.3 Oplození (fertilizace)

3.3.1 Kapacitace spermií

Kapacitace je maturační proces spermií probíhající v pohlavním ústrojí ženy. Bezprostředně po ejakulaci spermie není schopná oplození. Je nutné setrvání ejakulovaných spermií v reprodukčním traktu. Dochází k jevu zvanému hyperaktivace. Spermie výrazně změni charakter pohybu, pohybuje se rychleji a v kruhu. Kapacitace spermií je pozvolný proces, nekapacitují všechny najednou, ale ustanoví se populace kapacitovaných spermií. Pokud se tyto spermie nesetkají s vajíčkem, po krátkém čase umírají. Kapacitační změny na spermiích lze rozdělit do tří skupin:

- Změny v proteinovém obalu spermie na jejím povrchu
- Změny v cytoplazmatické membráně
- Změny v cytoplazmě

Změny na povrchu spermie:

V průběhu kapacitace dochází ke změnám v proteinovém složení povrchu spermií. Proteiny na povrchu spermií vytvoří ochranný obal pro průchod samičím traktem a umožňují navázání spermií na stěnu vejcovodu. Vytvoří ze tzv. rezervoár spermií ve vejcovodech, díky kterému se prodlouží životnost spermií a tím se zvýší pravděpodobnost početí.

Změny v cytoplazmatické membráně:

Během kapacitace dochází k odstraňování cholesterolu z membrány, zvyšuje se fluidita membrány. Po odstranění inhibičních proteinů dochází k aktivaci iontových kanálů. Změny ve složení cytoplazmatické membrány vedou k destabilizaci membrány a připravují spermii na akrozomální reakci.

Změny v cytoplazmě:

V průběhu kapacitace se spermie připravuje na fúzi s vajíčkem. Dochází ke kaskádě chemických procesů. Zvyšuje se koncentrace cytoplazmatického Ca^{2+} a HCO_3^- . Zvýšená koncentrace HCO_3^- vede ke zvýšení pH uvnitř spermie a zvýšení koncentrace cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) pomocí HCO_3^- dependentní adenylyl cyklázy. Konečným výsledkem je fosforylace tyrosinu některých cytoplazmatických proteinů. Aktivita adenylyl cyklázy je také zvýšena reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) jako H_2O_2 , O_2^- a NO.

V cytoplazmě přítomný aktin G, začne polymerizovat na aktin F. Polymerizace aktinu, vede k přesunu fosfolipázy C z cytoplazmy do cytoplazmatické membrány. Během akrozomové reakce aktin F zpětně velmi rychle depolymeruje. Tím se umožní kontakt cytoplazmatické membrány s vnější akrosomovou membránou.

Výsledkem kapacitace je schopnost spermie chemotaxe a thymotaxe – schopnost spermie aktivně vyhledat vajíčko. Spermie jsou schopné vazby na glykoproteinový obal vajíčka – *zona pellucida* a podstoupit akrosomální reakci (Vacek, 2006).

3.3.2 Fertilizace

Po ovulaci je vajíčko zachyceno rozšířeným ústím vejcovodu a za součinnosti rytmických stahů hladké svaloviny vejcovodu a míhání řasinek epitelových buněk sliznice vejcovodu je nesen směrem k děloze. V ampulárním úseku vejcovodu se vajíčko setká s kapacitovanými spermii.

Spermie se po setkání s vajíčkem shlukují na jeho povrchu, obráceny hlavičkou směrem k vajíčku a snaží se proniknout mezi folikulárními buňkami *corona radiata* k *zona pellucida*. Při proniknutí spermii mezi folikulární buňky jim napomáhá k rozrušování mezibuněčných kontaktů enzym hyaluronidáza, uvolňován z akrozomálního váčku, i

vlastní bičíkovitý pohyb. Při vazbě spermií k povrchu *zona pellucida* se uplatňují specifické membránové receptory oocyty, mají charakter glykoproteinů (zona protein, ZP-3). Receptorům oocyty odpovídají molekuly specifického proteinu, zvaného bindin, lokalizované v plazmalemě spermie (Vacek, 2006).

Pro řádný průběh akrozomální reakce jsou nezbytné kalciové kationty. Při akrozomální reakci splyne zevní membrána akrozomálního váčku s plazmalemou spermie na vrcholu hlavičky v jednotnou membránu. Ta se rozpadá a aktivované enzymy akrozomálního váčku pronikají do *zona pellucida*. Hyaluronidáza se uplatňuje zejména při rozrušování mezibuněčných kontaktů folikulárních buněk *corona radiata* a jejich uvolňováním ze spojení se *zona pellucida*. Dalším enzymem je akrozin, který rozpouští *zona pellucida* a usnadňuje cestu spermií k buněčné membráně oocyty.

Hlavička spermie se při pronikání skrze *zona pellucida* prodlouží ve výběžek pokrytý zbytky membrány a sekretem akrozomálního váčku. Jakmile pronikne spermie do vajíčka, ihned se rozvine kortikální reakce, která zabrání vstupu další spermie do vajíčka. Podstatou kortikální reakce je stabilizace *oolemy* a přilehlé vrstvy *zona pellucida*, které se tak stanou nepropustnými, neproniknutelnými pro další spermie. Takto stabilizovaný obal oplozeného vajíčka se nazývá fertilizační membrána. Kortikální reakcí současně ztrácejí vazebnou schopnost proteinové receptory v *zona pellucida*, nemohou tedy vázat další spermie.

Hlavní význam oplození spočívá v obnovení diploidní sady chromosomů (46), z nichž polovina pochází od matky, druhá od otce, a v určení pohlaví nového jedince, jehož vývoj oplozením začíná (Vacek, 2006).

3.4 Fáze embryonálního vývoje

Vývoj člověka může být rozdělen do tří fází, které jsou do jisté míry navzájem spolu spjaté:

- první fází je růst (zvětšování velikosti), jež zahrnuje dělení buněk a vytváření buněčných produktů.
- druhou vývojovou fází je morfogeneze (vývoj tvaru), která v sobě zahrnuje množství buněčných pohybů. Pohyb buněk umožňuje jejich vzájemnou interakci během formování tkání a orgánů.

- třetí fázi je pak diferenciaci (zrání fyziologických pochodů). Dověšení diferenciaci má za následek vznik tkání a orgánů, které jsou schopny zastávat specializované funkce (Moore, 1998).

Blastogeneze

Blastogeneze zahrnuje časné období vývoje od vzniku zygoty, její rýhování v morulu, přeměnu moruly v blastocystu až po diferenciaci zárodečných listů. Časově se jedná o období začínající několik hodin po oplození až asi do konce 2 týdne po oplození. Jde o rozdělení umělé, z důvodu didaktických, blastogeneze se netýká jen vývoje vlastního zárodku, pokračuje současně i diferenciaci trofoblastu, utvářejí se základy cévního systému (Vacek, 2006).

Rýhování

Prvním rýhovacím dělením se oplozené vajíčko (zygota) rozdělí na 2 téměř stejné blastomery, uložené uvnitř *zona pellucida*. Dvoubuněčného stádia je dosaženo za 24-30 hodin po oplození. Čtyřbuněčného stádia je dosaženo asi za 40-50 hodin po oplození.

Blastomery do osmi až dvanáctibuněčného stádia jsou od sebe zřetelně odděleny. Mitotickým dělením vznikají další blastomery, současně se mezi blastomery v povrchové vrstvě utvářejí těsné mezibuněčné kontakty – vzniká morula, která nabývá

kompaktnějšího vzhledu. Až doposud byly všechny blastomery zcela identické. Zatímco blastomery povrchové vrstvy jsou mezi sebou spojeny těsnými kontakty (tight junctions), mezi blastomery uvnitř útvaru se vytvoří „kanálovitá spojení“ (gap junctions). Rozdíly v propustnosti mezibuněčných kontaktů se uplatňují v prvním pochodu diferenciaci. Zevní blastomery se přemění v buňky zevní obalové vrstvy – příští trofoblast, blastomery uvnitř útvaru vytvoří vnitřní buněčnou masu – příští embryoblast. Obě dvě tkáně se liší strukturou, funkcí i genovou expresí. Trofoblast má schopnost syntetizovat hormon zvaný choriový gonadotropin (hCG) a podílet se na tvorbě steroidů (Vacek, 2006).

Zvýšeným příjmem tekutiny z okolí, která prostupuje *zonou pellucidou* a hromadí se mezi buňkami vnitřní buněčné masy a obalovou vrstvou, vznikne uvnitř blastocysty dutina (blastocel). Buňky vnitřní buněčné masy se přitom přeskupí jako embryoblast k jednomu pólu vzniklého váčku zvaného nyní blastocysta. Na povrchu je ohraničena jednou vrstvou plochých buněk obalové vrstvy, zvané nyní trofoblast.

Postupným zvětšováním objemu blastocysty, v důsledku hromadění tekutiny uvnitř embrya, dochází k postupnému ztenčování *zona pellucida*. Vzniklý tlak uvnitř blastocysty naruší zevní obal embrya (*zona pellucida*) a to vzniklým otvorem „vycestuje“ a uhnízdí se v děložní sliznici. Tento vývoj od oplození až k vycestování blastocysty trvá cca 5-6 dní od oplození oocyty (Vacek, 2006).

Podstatou rýhování je řada po sobě následujících mitóz. Oproti běžné mitóze buněk je však rozdíl v tom, že dceřiné buňky, zvané blastomery, v relativně krátké interfázi po replikaci chromozómů, nenabývají velikosti mateřské buňky, ale vstupují ihned do další mitózy, takže se postupně zmenšují. Rýhování tak zabezpečuje postupné obnovení velikosti buněk, charakteristické pro příslušný druh živočišné tkáně (Vacek, 2006).

Mitóza

Každý chromosom je vždy replikován před začátkem dělení buňky - interfáze. Každý chromosom se podélně rozděluje do identických polovin (chromatid), které se navzájem oddělují. Oddělené chromatidy chromosomů se přesouvají k pólům buněk a každá se stává součástí formujícího dceřiného jádra (Trávník, 2009).

Mitóza je kontinuální proces, který je rozdělen do čtyř fází:

Interfáze

Je část cyklu, kdy je chromatin uložený v jádře a jednotlivé chromosomy nejsou opticky rozlišitelné. Podle biochemických změn se interfáze člení na G₀, G₁, S a G₂ fázi. Délka G₀ fáze je nestabilní. Do této fáze může buňka přijít ihned po dělení a je pro ni charakteristická slabá syntéza RNA. Vstup buňky do této fáze ovlivňuje nedostatečné vnitřní a vnější podmínky pro dělení. G₁ fáze je interval od ukončení nepřímého dělení buňky do začátku replikace DNA - trvá několik hodin až dní. Dochází zde k syntéze RNA a proteinů (enzymů, histonů, fosfolipidů a nehistonových bílkovin). Fáze S, neboli syntetická fáze je charakteristická replikací (zdvojením) DNA. Pokračuje však i syntéza RNA a proteinů. S fáze trvá 6 - 8 hodin. V G₂ fázi je ukončena syntéza DNA a trvá 2 - 6 hodin. V této fázi je v buňce 4n chromosomů.

Profáze

Následuje přímo po G₂ fázi interfáze. Začíná mírným zvětšením jádra, které způsobuje příjem vody z okolní cytoplazmy. Spiralizací chromatinu se chromosomy postupně

zkracují a sílí, což má důležitý funkční význam. Chromosomy se zviditelňují a mají tvar tenkého vlákna. Od začátku profáze se hmota chromosomů formuje do dvou vláken - chromatid, které jsou vlastně samostatné funkční jednotky spojené centromerou. Dvojice centriolů putují k opačným pólům. Na konci profáze se rozpadá jaderná membrána, mizí jadérko a chromosomy jsou ve vysokém stupni spiralizace. Vzniká mitotický aparát, formují se astrální a kinetochórová vlákna dělicího vřetenka. Celá profáze trvá 30 - 60 minut.

Metafáze:

Lze členit na metakinezi (prometafáze) a vlastní metafázi. Při metakinezi začíná shromáždění a uspořádání chromozomů do ekvatoriální (centrální) roviny buňky (tento krok chybí u některých hub a rostlin). Dochází k autoorientaci chromosomů svými kinetickými místy na centromeře směrem k pólům buňky (stabilní poloha v ekvatoriální rovině) a k distribuci (speciálnímu seřazení) chromosomů. V metafázi jsou chromosomy specificky uspořádány v ekvatoriální rovině. Dochází k největší spiralizaci a zkrácení chromosomů a proto se v tomto stádiu provádí cytogenetické studie založené na morfologii chromosomů. Na centromeru chromosomů se připojuje dělicí vřetenko.

Anafáze

Je plynulé pokračování metafáze. Na počátku nastane simultánní rozdělení centromer a oddělení sesterských chromatid v centromerách. Na centromery připojené dělicí vřetenko svojí kontraktivní činností přesouvá chromosomy z ekvatoriální roviny k pólům buňky. Při podélném rozdělení centromery jsou k opačným pólům přesouvány kopie chromosomů (chromatidy) vytvořených při replikaci DNA. Rozdělení chromosomů je poměrně rychlé, proto anafáze trvá jen několik minut. Zároveň postupně dochází k prodlužování buňky a začíná *cytokineze*.

Telofáze

Je charakteristická seskupením chromosomů u pólů buňky. Chromosomy se postupně despiralizují a rozplétají do funkční, aktivní formy. Jaderná membrána se opět obnovuje a spojuje a v obou nových jádrech se objevují jadérka. Dělicí vřetenka zanikají a buňka dokončuje cytokinezi.

Výsledkem mitotického dělení je vznik dvou buněk se stejným počtem chromosomů, které měla buňka původní – mateřská (Trávník, 2009).

Implantace, nidace, vývoj zárodku

Po vycestování ze *zona pellucida* se buňky trofoblastu dostávají do přímého kontaktu s epitelem děložní sliznice. Blastocysta se přikládá k povrchu děložní sliznice tím pólem, kde je přiložen embryoblast. Děložní sliznice se v této době nachází v plné sekreční fázi. V zóně kontaktu blastocysty s povrchem děložní sliznice se rozvine intenzivní interakce (Vacek, 2006).

Celý tento proces je složen z mnohastupňových dějů mezi endometriem, trofoblastem a embryem. Probíhá pod vlivem celé řady zevních a vnitřních faktorů, které nejsou dodnes dostatečně objasněny. Hlavní fáze dějů, které vedou k implantaci embrya, jsou adheze embrya na povrch endometria, interakce buněk endometria a trofoblastu. Překonání mucinové bariéry a průnik trofoblastu, následován proliferací a syncytializací trofoblastu a na závěr decidualizace.

8. den vývoje

Diferenciace trofoblastu

Blastocysta se zanořuje do děložní sliznice pólem obsahujícím embryoblast. V úseku embryoblastu se trofoblast dělí ve dvě zřetelné vrstvy:

- a) zevní mnohojadernou zónu s nerozlišitelnými hranicemi buněk - tzv. *syncytiotrofoblast (plasmoditrofoblast)*
- b) vnitřní vrstvu mitoticky aktivních kubických až cylindrických buněk - *cytotrofoblast*, jehož dceřiné buňky putují směrem ke syncytiotrofoblastu, kde splývají, ztrácejíce mezibuněčné hranice (Jelínek et al., 2000).

Diferenciace embryoblastu

Původní vnitřní buněčná masa se též rozděluje do dvou vrstev:

- a) vrstva malých kubických buněk, zvaná *hypoblast*, jež je přivrácena k blastocoelu
- b) vrstva vysokých cylindrických buněk, přivrácená k *cytotrofoblastu* embryonálního pólu - *epiblast*.

Obě vrstvy spolu vytvářejí plochý základ embrya v podobě dvouvrstevného terčíku - *bilaminární blastoderm*. Vznikem *bilaminárního blastodermu* - vlastního základu embrya, končí období blastogeneze a začíná embryogenese.

Prakticky současně s rozdělením embryoblastu se uvnitř epiblastu objeví dutinka, která rychle expanduje, vytvářejíc amniovou dutinu (*cavum amnii*). Ty buňky epiblastu, které

se expanzí amniové dutiny přiloží k *cytotrofoblastu*, se oplošťují ve výstelku amniové dutiny a dále jsou nazývány *amnioblasty* (Jelínek et al., 2000).

9. den vývoje

Výrazně se rozvíjí trofoblast, především na embryonálním pólu. Devátý den je již celá blastocysta zanořena do povrchové vrstvy kompakty a dosahuje průměru 2 - 3 mm. Implanční otvor v děložní sliznici se uzavře fibrinovým koagulem, přes které přeroste tenká vrstvička děložní sliznice včetně epitelu. Ve zbytnělé mase *syncytiotrofoblastu*, rychle nahlodávající vazivové stroma *lamina propria*, se objevují vakuoly a dutinky splývající ve větší prostory - lakuny. Odtud název *lakunární stadium* vývoje *trofoblastu*. Vrstva plochých *amnioblastů*, vystýlajících zvětšující se dutinu amniovou, plynule přechází ve vysoké buňky epiblastu zárodečného disku. Podobně na jeho spodní straně, hledící do dutiny blastocysty, se odštěpují buňky hypoblastu a vystýlají prostorný *blastocoel*, vytvářející *exocoelomovou (Heuserovu) membránu*. Blastocoel, vystlaný *exocoelomovou* membránou se označuje jako *exocoelom*, čili *primitivní žlutkový vak*.

Na sklonku 9. dne je embryo obklopeno dvěma dutinami. Na straně epiblastu dutinou amniovou, na straně hypoblastu *exocoelomem* (Jelínek et al., 2000).

10. – 12. den vývoje

Plodové vejce je kompletně zanořeno do endometria a implantační místo kryje zregenerovaný epitel, který přemostil fibrinovou zátku. Kapiláry děložní sliznice reagují na přítomnost plodu přeplněním a rozšířením, mění se v široké *sinusoidy*.

Syncytiotrofoblast na vodícím implantačním pólu blastocysty rozrušuje stěny sinusoid a krev se vylévá do trofoblastických lakun. Buňky trofoblastu tak získávají přímý kontakt s mateřskou krví, mění se dosavadní histiotrofní způsob výživy na *hemotrofní* a vzniká *primitivní uteroplacentární cirkulace*. Okolní buňky endometria se zvětšují, střeďajíce glykogen a lipidy. Tato změna spolu s rozšířením cév se označuje jako *deciduální reakce* a takto reagující děložní sliznice jako *membrana decidua*.

V této době se ve štěrbině mezi *cytotrofoblastem* a *Heuserovou membránou* objeví populace buněk zcela nového (neepitelového) charakteru, odvozená nejspíše z *cytotrofoblastu* a odděluje od *trofoblastu* nejprve *exocoelomovou membránu* a posléze i *amnion*. V této střední vrstvě jemného řídkého vaziva, zvané *extraembryonální mesoblast*, se záhy objevují dutinky splývající v *extraembryonální coelom*. Dosud nejpomaleji rostoucí součást plodového vejce - zárodečný terčík, se začíná prodlužovat (Jelínek et al., 2000).

13. – 14. den vývoje

Implantační defekt děložní sliznice je zcela zhojen, avšak přesto může dojít k úniku krve z přeplněných trofoblastických lakun do dutiny děložní. Proto se kolem 28. dne po začátku poslední menstruace někdy dostaví slabé krvácení. Buňky *cytotrofoblastu* místy intensivně proliferují a pronikají *syncytiotrofoblastem*. Vytvářejí tak buněčné sloupce, kryté *syncytiem - primární klky (villi primarii)*.

Zásadní změny se odehrávají i uvnitř plodového vejce. Dutina *extra embryonálního coelomu* se rozšíří po celém obvodu primitivního žloutkového vaku i *amniové dutiny* s výjimkou oblasti, kde vrcholek klenby amniového váčku ční proti *cytotrofoblastu* implantačního pólu blastocysty.

V tomto malém okrsku zůstává *mesoblast* intaktní, vytváří od této chvíle jediné spojení embrya s trofoblastem, nazvané příhodně *zárodečný stvol* (základ budoucího pupečnicku). Současně vycestovává z hypoblastu další populace buněk, které migrují směrem od zárodečného terčíku po vnitřním povrchu *exocoelomové membrány*, tvarující uvnitř *extraembryonálního coelomu* další kompartment – sekundární, čili definitivní žloutkový vak (*saccus vitellinus*). Stěna žloutkového vaku se uzavírá ještě před tím, než migrující buňky dosáhnou embryonálního pólu *exocoelomu*, a odškrcuje tak zbylou jeho část v podobě *exocoelomových cyst*. S pokračující rychlou expansí *extraembryonálního coelomu* jsou zbytky *exocoelomu* dislokovány daleko od embrya a zanikají. *Extraembryonální coelom* se nazývá dutina choriová a její stěna choriová plotna vytvářející choriový vak. *Trofoblast* choria produkuje hormon choriový gonadotropin (hCG - Human Chorionic Gonadotropin).

Na konci 2. týdne má embryo podobu dvouvrstevného terčíku hledícího do dutiny amniové ze strany jedné, a do dutiny žloutkového vaku ze strany druhé. Celý tento komplex je zavěšen prostřednictvím zárodečného stvolu v choriovém vaku, jehož stěnu tvoří *extraembryonální mesoblast*, *cytotrofoblast* a *syncytiotrofoblast* vystylající věnec lakun, naplněných mateřskou krví. Plodové vejce je celé zanořeno do endometria, odpovídajícího na jeho přítomnost deciduální reakcí (Jelínek et al., 2000).

Trilaminární blastoderm - vznik tkání

Gastrulace – vznik zárodečných listů

Rozhodující událostí třetího týdne vývoje je přeměna dvouvrstevného (bilaminárního) zárodečného terčíku v blastoderm trilaminární, sestávající ze tří zárodečných listů: ektodermu, mezodermu a endodermu. Proces, který vede k jejich vzniku, nazýváme analogicky podle vývoje u nižších obratlovců gastrulací.

Modelace primitivního proužku

Na počátku gastrulace vypadá zárodečný terčík jako podlouhlá dvouvrstevná placička, spleená z epiblastu a hypoblastu. Epiblast je tvořen vyššími cylindrickými buňkami, hledícími do dutiny amniové, zatímco buňky hypoblastu jsou opačným pólem přivráceny do dutiny žloutkového vaku. Buňky hypoblastu jsou podstatně nižší, s výjimkou ohraničené skupiny cylindrických elementů v přední, budoucí hlavové části blastodermu, vytvářející sférické ztlustění hypoblastu - prochordální ploténku.

Gastrulace počíná generalizovaným pohybem epiblastických buněk, který vějířovitě směřuje z předního a postranního obvodu ke střední osově části zárodečného terčíku. V důsledku toho se v tomto místě formuje podélný val - primitivní proužek, zakončený vpředu okrouhlým návalkem zvaným primitivní (Hensenův) uzal. Primitivní proužek je hlavním morfogenetickým centrem, v jehož ose migrující a intenzivně proliferující buňky *epiblastu* nabývají lahvovitého tvaru a zanořují se do štěrbiny mezi *epi-* a *hypoblastem*, aby daly vznik dvěma zárodečným listům mezodermu a endodermu. Epiblast, pod který se oba listy zasunují, se nazývá *ektoderm*. Tímto pochodem nově vzniká zárodečný terčík, složený ze tří vrstev majících původ v epiblastu, zatímco tkáň odvozené od hypoblastu se uplatní pouze při formaci orgánů extraembryonálních.

Zanořování souvislé epitelové vrstvy epiblastu směrem do nitra blastodermu (tzv. *invaginace*) zanechá na primitivním proužku stopu v podobě primitivní brázdičky, prohlubující v Hensenově uzlu primitivní jamku. Invaginované buňky rozvolňují své mezibuněčné kontakty, cestují po spodní ploše ektodermu kupředu a do stran a záhy se na obvodu propojí s elementy mezoblastu. Takto vzniká střední zárodečný list - *intra-* a *extraembryonální* mezoderm. Je třeba zdůraznit, že mezoderm nemá na tomto stadiu charakter souvislého epitelového listu, takže bychom jej podle histologické stavby měli správně označovat jako (primární) mezenchym.

Proudu mezodermových buněk se vpředu postaví do cesty prochordální ploténka, pevně fixovaná k epiblastu v místě příštího rozhraní mezi ektodermem ústní dutiny a endodermem hltanu - *membrana oropharyngea*. Buňky ji obejdou z obou stran a vpředu se opět spojí v kardiogenní zónu - budoucí základ srdce. Jiné z migrujících buněk vytlačují původní hypoblast, aby jej nahradily opět souvislou vrstvou zvanou *intraembryonální endoderm*. Mateřskou tkáň všech tří zárodečných listů je tedy epiblast (Jelínek et al., 2000).

Formování notochordu

Buňky, které se zanořují v primitivní jamce, migrují pod ektodermem přímo vpřed až k prochordální ploténce, formující tubulární osovou strukturu - hlavový výběžek notochordu. Ten, spolu s mezodermem koncem 17. dne kompletně oddělí ektoderm od endodermu s výjimkou zmíněné *membrana oropharyngea* a na zadním konci primitivního proužku analogicky vytvořené *membrana cloacalis*. *Membrana cloacalis* bude na aborální konci trávicí trubice plnit obdobnou funkci jako *membrana oropharyngea*, oddělující dočasně ektodermový základ konečníku od endodermu zadního střeva. V místě obou membrán zůstává ektoderm s endodermem pevně spojen.

Osmnáctý den splyne spodní obvod trubky hlavového výběžku s přilehlým endodermem a v místě tohoto spojení buňky obou struktur vymizí. *Notochord* je tak nakrátko inkorporován do endodermu. Záhy se opět od endodermu odděluje v definitivní formě solidního pruhu buněk, který tvoří pevnou osu embrya od prochordální ploténky k Hensenovu uzlu. V místě primitivní jamky je tak přechodně propojena amniotická dutina se žloutkovým vakem (*canalis neurentericus*).

Na zadním konci kloakální membrány se stěna žloutkového vaku vychlípne do zárodečného stvolu a vytváří základ dalšího z přídatných embryonálních orgánů - *allantois*. V endodermu žloutkového vaku, při odstupu *allantoické* výchlípky, lze ve třetím týdnu nalézt prvopohlavní buňky, jež se před tím vydělily z populace *embryoblastu*, unikající všem morfogenetickým interakcím, provázejícím raný embryonální vývoj (Jelínek et al., 2000).

Indukce neurální ploténky a kaudální morfogenetický systém

Interakce buněčné populace *notochordu* s přilehlým *ektodermem* vyvolá polyklonální determinaci ektodermu, nazývanou neurální indukce. Morfologicky se projeví zřetelnou

polarizací ektodermových elementů, které se zvyšují, nabývajíce lahvovitého tvaru s hrdlem přivráceným k amniové dutině. Determinované buňky ektodermu nazýváme souhrnně *neuroepitel*. Neuroepitelové buňky vytvářejí kraniálně od Hensenova uzlu ztluštělou neurální ploténku s mírně vyduťtými okraji - neurálními valy. Neurální valy lemují mělkou neurální brázdičku, v jejímž pokračování leží za Hensenovým uzlem brázdička primitivního proužku. Na tomto stadiu je indukci vytvořen pouze základ mozku a celá oblast před Hensenovým uzlem odpovídá příští hlavové krajině.

Výstavba osových struktur embryonálního trupu, tzv. notogeneza, je uskutečňována funkcí systému, zahrnujícího primitivní proužek, oblast ektodermu v okolí Hensenova uzlu a intenzivně proliferující blastém rozšířeného zadního konce chordy, tzv. kaudální proliferací centrum. Celý tento komplex pak můžeme označit jako kaudální morfogenetický systém (Jelínek et al., 2000).

Kaudální morfogenetický systém funguje v cyklu, jenž lze na základě poznatků experimentální embryologie popsat takto:

- a) V oblasti brázdičky primitivního proužku pokračuje invaginace mitoticky aktivních buněk, plynule vytvářejících mezodermový a endodermový list.
- b) Zadní konec chordy (kaudální proliferací centrum) se v ose primitivního proužku podsunuje pod primitivní brázdičku a determinuje ji na neuroepitel. Při svém sestupu mívá svaz mezodermových elementů, jež se zhušťují po obou stranách nově vznikajících úseků notochordu v podélné sloupci *paraxiálního mezodermu (somitové plotny)*, ztenčující se do stran v tzv. mezodermové plotny laterální.
- c) Sestupem kaudálního proliferací centra je vysunována osová část již existující neurální ploténky směrem vzad, což vede k jejímu prodlužování a současnému zužování oddílů předních. Tento proces významně přispívá k přeměně neurální ploténky v trubici (k tzv. neurulaci).
- d) Buněčný materiál horní etáže novotvořené části *notochordu* splývá s transformovanou primitivní brázdičkou a postupně přispívá ke tvorbě neurální trubice.
- e) Přítomnost neurálního materiálu přiměje *paraxiální mezoderm* k segmentaci a vytváření párových kubických útvarů zvaných somity. Somity vznikají v cefalokaudálním sledu po obou stranách neurální trubice. Tento proces postupně spotřebovává materiál primitivního proužku, který se zkracuje a mizí.

V období notogenezy je v buňkách, které se na ní podílejí, transkribována charakteristická sekvence 180 párů nukleotidových bází, zvaná homeobox. Narušení funkce kaudálního morfogenetického systému má za následek vznik těžkých vývojových vad,

kteře ve více než 99% vedou k zániku plodu. Patří k nim defekty neurální trubice a defekty trupu od úplného chybění dolní části, přes splynutí obou distálních končetin v jeden pahýl (*sirenomelie*), částečné či úplné chybění kosti křížové až k atrézii konečnku. Popsaná skupina vývojových vad trupu je zahrnována pod *syndrom kaudální regrese* (Jelínek et al., 2000).

Další vývoj trofoblastu

Do osových částí primárních klků proniknou nejprve elementy mezoblastu choria, vytvářejíce tak vazivové stroma, jehož přítomnost charakterizuje klky sekundární. V řídkém vazivu stromatu se záhy začnou některé mezenchymové buňky diferencovat v krevní elementy, kapiláry a drobné cévy, které se napojují na cévy vznikající obdobně v choriové pltně a mezoblastu zárodečného stvolu. Klky protkané cévami označujeme jako klky terciární.

Cytotrofoblast nepřestává proliferovat, proniká syncytiotrofoblastem až k deciduálně změněnému endometriu, kde vytváří souvislou vrstvu cytotrofoblastických elementů. Koncem třetího týdne jsou vznikem zárodečných listů a osových orgánů i vydělením prvopohlavních buněk položeny základy pro diferenciaci všech soustav, orgánů a tkání jedince (Jelínek et al., 2000).

Embryonální perioda - deriváty zárodečných listů

Embryonální periodou označujeme období prenatalní ontogeneze zahrnující 3. až 8. týden po oplození. V tomto klíčovém období tvarového vývoje vznikají kombinací buněk zárodečných listů základy orgánových systémů a z nich po té základy orgánů, a proto je tento časový úsek kritickou morfogenetickou periodou hrubých strukturálních vývojových vad, tzv. malformací. Embryonální období končí okolo 56. dne, kdy jsou vytvořeny základy všech orgánů, jimiž je člověk v dospělosti vybaven (Jelínek et al., 2000).

3.4.1 Celkový vývoj zárodku

Vývoj na úrovni organismu je v tomto období charakterizován čtyřmi fenomény. Jsou to:

- růst
- segmentace
- vytváření záhybů
- organogeneze

Růst a segmentace se především týkají ekto- a mezodermu, vytváření záhybů formuje Endoderm.

Růst

Podkladem růstu zárodku, který se od 3. do 8. týdne zvětší zhruba stokrát (cca 0.3-30 mm), je buněčná proliferace, v menší míře pak vytváření mezibuněčné hmoty buňkami mezenchymu i vznik dutinek a dutin. Hlavní růstové centrum zárodku představuje zpočátku kaudální morfogenetický systém, místo nejintenzivnější syntézy DNA, RNA i proteinů. Z jeho funkce vyplývá, že zárodek roste především do délky. Později dominují růstová centra v hlavovém konci.

Segmentace

Segmentace umožňuje přeměnu spojitého gradientu genové exprese v lokálních buněčných populacích v diskrétní, přesně ohraničené a po stránce informačního obsahu zřetelněji definované podjednotky. Tyto přechodné útvary, nazývané v oblasti základu CNS *neuromery* a v oblasti paraxiálního mezodermu *somitomery*, později opět splývají (už jako více či méně vyhraněná individua), vytvářejíce morfogenetické systémy jednotlivých orgánů. Výsledkem segmentace je nerovnoměrná distribuce genových produktů do různých částí základu CNS, které se od sebe na molekulární úrovni odlišují.

Segmentace je ještě zřetelnější v paraxiálním *mezodermu*, který se v předozadním sledu organizuje v *somitomery* již od počátku 3. týdne. Buňky, původně vytvářející souvislý list, se po obou stranách neurální trubice shlukují kolem center odpovídajících polohou neuromerám. Laterálně, na periferii *somitomer*, přetrvává souvislé uspořádání mezodermu v podobě laterální plotny.

Splývající dutinky, které se v ní objeví, rozštěpí posléze plotnu v list somatický či parietální, příkládající se zespoda k *ektodermu* a list splachnický či viscerální, spojující se s extraembryonálním *mezoblastem*, kryjícím žloutkový vak. Somatický a splachnický mezoderm je mateřskou tkání mezotelu parietálních a viscerálních listů serózních blan (pleura, peritoneum).

Hranice mezi *somitomerami* v oblasti hlavy záhy opět mizí a buněčný materiál, různě determinovaný v procesu segmentace, vytvoří příčně pruhovanou svalovinu kraniofaciální a *mezenchym neurokrania* (zdrojem mezenchymu v oblasti splachnokrania je neurální lišta). Kaudálně od krajiny okcipitální se *somitomery* organizují v somity, ve své prvotní podobě duté kuboidní útvary, vznikající v cefalokaudální sekvenci aktivitou kaudálního morfogenetického systému. Na rozdíl od *somitomer*, které představují shluky volných mezenchymových buněk vírovitě se stáčejších okolo kondenzačních center, jsou buňky *somitů* mezi sebou propojeny buněčnými kontakty okolo centrálních dutin, nabývajíce epiteloidního palisádovitého uspořádání. Na konci 5. týdne tak nacházíme 42 - 44 somitových párů lemujících míšní *primordium*. *Somity* jsou útvary dobře viditelné a natolik charakteristické, že jejich počet je na raných stádiích dobrým ukazatelem vývojového stadia, ve kterém se zárodek nachází. Klíčovou úlohu ve vývoji urogenitálního systému sehraje buněčný materiál, spojující *somity* s laterální plotnou - tzv. *intermediární mezoderm* (Jelínek et al., 2000).

Vytváření záhybů

Aktivitou kaudálního morfogenetického systému a růstem přední části neurální trubice, se zárodek rychle prodlužuje a v souvislosti se *somitogenezí* nabývá i na šířce.

Výsledkem těchto dvou intenzivních růstových procesů je, že zárodek vyvstává nad původní rovinu blastodermu směrem do dutiny *amniové*, za vzniku dvou transverzálních a dvou podélných záhybů. První dva nacházíme na předním a zadním pólu (záhyb hlavový a kaudální), druhé dva (záhyby laterální) probíhají v dlouhé ose zárodku. Zatímco embryo se v *amniové* dutině prudce rozvíjí a roste, kdysi relativně široké propojení se žloutkovým vakem se výrazně zužuje, především v souvislosti s vývojem srdce a jater vepředu a *allantoické* výchlípky vzadu.

Vzniká tak úzká stopka žloutkového vaku - *ductus vitellinus* - komunikující s dutinou vystlanou endodermem, pasivně sledujícím expandující ekto- a mezoderm. Tato dutina, ohraničená zpočátku vpředu pomocí *membrana oropharyngea (buccopharyngea)* a vzadu *membrana cloacalis*, se nazývá primitivní střevo - základ budoucího *canalis alimen-*

tarius - trávicí trubice. S rozvojem hlavového a kaudálního záhybu lze záhy rozpoznat v základu trávicí trubice tři úseky. Přední střevo, oddělené od ektodermem vystlaného *stomodea* (základu dutiny ústní) v horní části hlavového záhybu bukofaryngeální membránou.

Zadní střevo s výchlípkou *allantois*, oddělené od ektodermem vystlaného *proktodea* (základu řiti) v dolní části kaudálního záhybu kloakální membránou. Střední střevo, které zůstává ve spojení se žloutkovým váčkem prostřednictvím *ductus vitellinus*, jež později označíme jako *ductus omphaloentericus*. Dutina předního střeva se vychlípne mezi postupně vznikající *faryngeální* (ve fylogeneze původně žaberní) oblouky, vytvářející *faryngeální* výchlípky. Z *endodermové* výstelky primitivního střeva a intraembryonálních částí *ductus vitellinus* a *allantois* posléze vzniká:

- epitel trávicí trubice od faryngu až po rectum
- epitel středního a dolního úseku respiračního traktu,
- parenchym gl. thyreoidea a parathyreoidea,
- parenchym jater a pankreatu,
- retikulární stroma thymu a tonzil,
- výstelka *cavum tympani* a tuba *pharyngotympanica* a epitel uretry a močového měchýře.

Organogeneza

Buňky zárodečných listů, které, jak bylo ukázáno, prošly vývojem odlišným v prostoru a čase a obsahují proto různé genové produkty, vytvářejí izogenetické lokální buněčné populace, které se vzájemně ovlivňují v rámci morfogenetických systémů. Výsledkem je polyklonální determinace - indukce orgánových základů, jejich komponent a tkání se specifickou stavbou a funkcí. Každý orgán je výsledkem interakce buněk nejméně dvou zárodečných listů, přičemž funkci induktoru zastává především mezenchym. Embryonální období je hlavní organogenetickou fází (Jelínek et al., 2000).

Vývoj zevního tvaru

Charakteristickými útvary zárodka koncem 4. týdne, ve směru předozadním, jsou mozkové váčky se základem očí a vnitřního ucha, faryngeální oblouky, srdeční hrbol a 25-30 *somitů* konturujících konvexní, lukovitě prohnutý hřbet, končící hrotem ocasu. Neurální trubice je na obou pólech (bývalý přední a zadní neuroporus) dokonale uzavřena.

Pod středem konkávní strany břišní vyvstává jako nadmutý balón žloutkový vak, propojený se středním střevem pomocí *ductus vitellinus*, v jehož blízkosti se záhy vlivem růstových procesů ocitá výchlipka *allantois*.

V průběhu druhého měsíce enormně narůstá hlava, objevují a diferencují se základy končetin a formuje se obličej. Proximální končetinové pupeny vyrůstají začátkem 5. týdne po stranách trupu mezi čtvrtým cervikálním a prvním *thorakálním somitem*, základy distální se objeví o něco později kaudálně od pupečníku v úrovni dolních lumbálních a horních sakrálních *somitů*. Terminální část končetinových pupenů se záhy oplošťuje, odděluje se cirkulární konstrikcí od proximálně uložených cylindrických základů *cingula*, *stylopodia* a *zeugopodia*. Na této koncové, pádlovitě rozšířené části se záhy objeví čtyři radiální rýhy oddělující pět fylogeneticky dobře konzervovaných paprsků *pentadaktylního autopodia*. V důsledku cefalokaudálního vývojového gradientu daného funkcí kaudálního morfogenetického systému, jsou proximální končetinové pupeny z počátku o něco více diferencovány než základy končetin distálních. Potom, co základy všech pěti prstů jsou zřetelně viditelné, druhá cirkulární rýha - místo příštího loketního ohybu, oddělí od sebe *stylo-* a *zeugopodium* (Jelínek et al., 2000).

Fetální perioda

Vývoj fétu

Období od začátku 9. týdne do konce intrauterinního života (vývoje) je známé jako fetální perioda. Charakteristické pro toto období je vyžívání tkání a orgánů a rychlý růst těla zárodku.

Vyvolat vývojové strukturální malformace lze jen u několika málo orgánů (např. rozštěp močové trubice, malformace ušních boltců). Zato však lze vyvolat škálu drobných strukturálních malformací, které nelze odhalit pouhým pohledem, ale projevují se poruchou funkce orgánu (např. u CNS poruchou chování jedince).

Vývojové stáří fétu lze odhadovat měřením jeho délky. Nejčastěji se používá výška vsedě, tzv. temeno-kostrční (TK) délka. Méně často je používána temeno-patní (TP) délka. Je to z toho důvodu, že změřit fétus včetně nohou bývá obtížné, neboť nohy nejsou napjaté a chyba měření je velká.

Délka prenatálního vývoje (období početí - porod) trvá 266 dní, tj. 38 týdnů. Gynekologové však udávají délku těhotenství od prvního dne poslední menstruace, tj. 280 dní = 40 týdnů. Odhadovat stáří zárodku lze nejen jeho měřením, ale i vážením. Poslední dva měsíce prenatálního života však fétus svou hmotnost prakticky zdvojnásobí. Oba para-

metry - jak délkový, tak váhový, selhávají při odhadu věku zárodku v těch případech, kdy došlo k opoždění vývoje plodu - růstové retardaci. Růstová retardace zárodku se vyskytuje často u plodů s vývojovými strukturálními anomáliemi, ale někdy i u plodů, které nemají viditelnou strukturální anomálii (dvojčata, matka kouřila během těhotenství).

Dále je důležité vědět, že existují pohlavní rozdíly v porodní hmotnosti novorozenců - děvčata jsou asi o 200 g lehčí než chlapci. K určení stáří spontánně potracených zárodků, nebo u novorozenců s nízkou porodní hmotností, je pak zapotřebí použít další morfologická kritéria (Jelínek et al., 2000).

Morfologické změny fétu během 3. - 9. měsíce

Velice pozoruhodnou změnou během fetálního vývoje je relativní zpomalení růstu hlavy vzhledem k růstu těla fétu. Počátkem třetího měsíce zaujímá velikost hlavy asi polovinu TK (CR) délky. Na počátku 5. měsíce zaujímá hlava jednu třetinu a při narození pouze jednu čtvrtinu celkové TP délky (měřeno od hlavy až k patě zárodku).

Během třetího měsíce prenatalního života se oči a uši dostávají do definitivní pozice na hlavě.

Končetiny jsou relativně delší ve srovnání s tělem, i když dolní končetiny jsou stále ještě menší než horní. Pohlaví plodu je již bezpečně rozpoznatelné. Zpočátku třetího měsíce je v pupečníku střevní klička (fyziologická pupečnicková hernie), která je vtažena okolo 11. týdne zase zpět do břišní dutiny. U plodů potracených na konci 3. měsíce je patrná muskulární aktivita. Tento pohyb však při normálním těhotenství matky ještě nevnímají.

Během 4. až 5. měsíce roste fétus velmi rychle a na konci první poloviny těhotenství dosahuje TK délky 15 cm (polovina délky při narození). Hmotnost však vzrůstá pomaleji a fétus váží okolo 500 g. Fétus pokrývají jemné chloupky - lanugo. Obočí a vlasy jsou viditelné. Pohyb fétu během 5. měsíce je matkou obvykle zcela jasně rozpoznatelný.

Ve druhé polovině těhotenství (6. až 10. měsíc) hmotnost plodu plynule narůstá. Výjimku tvoří poslední dva měsíce těhotenství, kdy se hmotnost plodu zdvojnásobí. Během 6. měsíce je kůže fétu načervenalá a vrásčitá, protože chybí tuková tkáň. Předčasně narozený fétus během 6. a první poloviny 7. měsíce má malou naději na přežití. Některé orgány jsou již schopné funkce, ale plíce ani centrální nervový systém nejsou dostatečně diferenciovány a koordinace mezi oběma životně důležitými orgány chybí.

Poslední dva měsíce těhotenství mizí vrásky na kůži, protože se pod kůži ukládá tuk. Kůže zárodka je pokryta bělavým mazem - *vernix caseosa*, jenž je secernován kožními žlázkami. Od 28. týdne těhotenství je fétus schopen přežít, i když s velkými potížemi. Na konci 9. měsíce je obvod hlavičky větší než obvod ramen, trupu a pánve, což je velmi důležitá okolnost, uplatňující se při průchodu plodu porodním kanálem. Donošený plod váží 3000 až 4000 g, TK délka je asi 36 cm a celková délka asi 50 cm. Testes mají být v šourku, nehty dosahují ke konečkům prstů, kůže je vyhlazena a obočí a řasy jsou dobře vytvořené (Jelínek et al., 2000).

3.4.2 Placenta a plodové obaly

Oboustranné funkční propojení mezi zárodkem a matkou je zajištěno pomocí placenty. Placenta slouží zárodku jako plíce, ledviny, střevo, pravděpodobně jako fetální játra a co více, i jako komplexní endokrinní orgán. Z krevního oběhu matky jsou do krevního oběhu zárodka aktivně transportovány kyslík a živiny, opačným směrem putuje kyslíčník uhličitý a nepotřebné metabolické produkty. Placentou proniká i většina léčiv a chemických látek z prostředí.

Vývoj placenty

Vývoj placenty začíná ihned po uhníždění blastocysty v endometriu dělohy. Na vzniku placenty se podílejí tkáň mateřské - těhotenské endometrium = *decidua* a tkáň embryonální - trofoblast. Obě části placenty mají odlišný genotyp a přesto po celou dobu těhotenství dobře "spolupracují". Přestože zárodek představuje cizorodý transplantát, nevyvolává za normálních okolností v mateřském organismu imunitní reakci vedoucí k odhojení (Jelínek et al., 2000).

Endometrium - deciduální reakce

V době nidace (cca týden po oplodnění) je endometrium na vrcholu sekreční fáze pro-
sáknuté tekutinou a skvěle prokrvené. Slizniční žlásky produkují hlenovitý sekret. Asi 2-3 dny po začátku implantace proběhne v endometriu dělohy tzv. deciduální reakce. Vazivové buňky endometria se přeměňují ve velké deciduální buňky, které obsahují velké množství glykogenu a kapének lipidů. Kapiláry se v okolí blastocysty zmnožují a mění se na tenkostěnné sinusoidy. Deciduální reakce se postupně rozšíří na celou dělož-

ní sliznici (*pars functionalis*), která se změní v "blánu padavou" - *membrana decidua*. Vzhledem k poloze zárodka rozlišujeme děložní sliznici na *decidua basalis* pod zárodkem (místo budoucí placenty), na *decidua marginalis* po stranách zárodka a na *decidua capsularis* nad zárodkem. Ostatní části děložní sliznice se nazývají *decidua parietalis* (Jelínek et al., 2000).

Trofoblast

Vývojovým prekurzorem parenchymu zárodečné části placenty je stěna blastocysty - trofoblast, který je odpovědný zpočátku vývoje za proces implantace (začíná 6. embryonální den). Trofoblast se diferencuje ve dvě morfologicky i funkčně odlišné části - cytotrofoblast - *Langhansovy* buňky (vnitřní část) a syncytiotrofoblast neboli plazmoditrofoblast (zevní část - myšleno z pohledu od zárodka). Buňky cytotrofoblastu se rychle dělí. Zároveň zanikají nebo se nevytvářejí buněčné membrány, čímž vzniká mnohojaderný útvar *syncytium*. *Syncytiotrofoblast* pučí do okolí ve formě prstovitých výběžků, které působením proteolytických enzymů narušují děložní sliznici. Rozpadlá děložní sliznice poskytuje výživný substrát pro zárodek – histiotrofické stádium výživy. Výživné látky procházejí *syncytiotrofoblastem* a *cytotrofoblastem* do zárodka. Po devátém dni vývoje zárodka se v *syncytiotrofoblastu* vytvářejí vakuoly, které splývají ve větší dutiny zvané lakuny - lakunární stadium vývoje trofoblastu. Lakuny se postupně vzájemně propojují a vytvoří tak prostorovou síť. Do těchto prostorů se při postupném narušování mateřských kapilár, které se překrví a přeměňují v tzv. sinusoidy, vylévá krev. Krev pak omývá *syncytiotrofoblast* a výživa jde k zárodku přímo z krve matky - hemotrofický způsob výživy. Tím se utvoří základ uteroplacentárního oběhu (Jelínek et al., 2000).

Tvorba choriových klků

Buňky *cytotrofoblastu* začínají po celém povrchu plodového vejce lokálně penetrovat do *syncytiotrofoblastu* a vytvářejí tak primární choriové klky. Sekundární choriové klky obsahují navíc, v centru klků, mezenchymové buňky z extraembryonálního mezodermu (asi 14. den vývoje). Ve třetím týdnu vývoje se začínají tvořit krevní ostrůvky v mezenchymu zárodka i v mezenchymu choriových klků. Z krevních ostrůvků se postupně stávají kapiláry. Choriové klky, které obsahují krevní kapiláry, nazýváme terciární. Tím je vytvořen předpoklad pro výměnu látek mezi krví matky, (která volně omývá povrch klků) a krví plodu (v kapilárách uvnitř choriových klků).

Chorion frondosum

Soustava terciálních choriových klků vyrůstající s choriové ploténky (tj. mezenchym krytý epitelem amnia) se nazývá *chorion frondosum*. Konce některých choriových klků vrůstají do decidui, kde jsou pevně uchyceny a nazýváme je úponové choriové klky. Ze svahů úponových klků vyrůstají tzv. volné klky, které se dále větví a rozrůstají. Úponové a volné klky tvoří dohromady fetální část placenty. Během dalšího vývoje placenty pak *chorion frondosum* zůstává pouze v oblasti *decidua basalis*, zatímco v oblasti *decidua capsularis* a *decidua marginalis* klky postupně degenerují a vzniká hladká oblast nazývaná *chorion laeve* (Jelínek et al., 2000).

Stavba zralé placenty

Placentu dělíme na fetální a mateřskou část podle toho, z které tkáně vznikla. Fetální část zralé placenty má dvě komponenty:

Choriová plotna (membrána)

Jedná se o vazivo (mezenchym) ve kterém vedou pupečnickové cévy. Ze strany plodu, je choriová membrána pokrytá epitelem *amnia*, se strany opačné, kde vyrůstají choriové klky směřující k decidui, je kryta *cytotrofoblastem* a *syncytiotrofoblastem*. Větve dvou umbilikálních arterií vstupují z choriové plotny do choriových úponových klků a do klků volných, kde se postupně větví na síť kapilár. Z volných klků se sbíhají venuly do vén v úponových klcích a ty ústí do původně dvou a později do jediné větve *vena umbilicalis* v choriové plotně. Vény vedou krev z choriové plotny do pupečnicku a do těla zárodku, arterie naopak. Umbilikální arterie vedou krev s nízkým obsahem kyslíku z plodu do placenty a umbilikální vena vede okysličenou a živinami bohatou krev z placenty do zárodku (Jelínek et al., 2000).

Choriové klky

Choriové klky vyrůstají na zevním povrchu choriové plotny. Uvnitř choriových klků je rosolovité vazivo, v němž jsou velké fagocytující Hofbauerovy buňky. Z počátku vývoje placenty je na povrchu klku souvislá vrstva *cytotrofoblastu* (Langhansovy buňky) a z nich vznikající vrstva *syncytiotrofoblastu*. Po 4. měsíci vývoje se buňky *cytotrofoblastu* postupně ztrácejí a netvoří už souvislou vrstvu. Rovněž vrstva *syncytiotrofoblastu* je ztenčena a na jeho povrchu se vytvoří lem z mikrokřků, což zvětšuje jeho resorpční plo-

chu. Ztenčení *syncytiotrofoblastu* a nesouvislost vrstvy buněk *cytotrofoblastu* umožňuje lepší přestup výživných látek z krve matky do krve zárodku.

Mateřská část placenty

Je tvořena bazální plotnou = *decidua basalis*, která obsahuje mateřské cévy a dna uterinních žlázek a je pokryta směrem k zárodku vrstvou trofoblastu. Trofoblastický obal je hraniční zónou mezi fetální a mateřskou částí placenty. Z bazální plotny směrem k fetální části placenty míří placentární septa, jež neúplně oddělují jamky v *decidua basalis*, vyhloubené jednotlivými fetálními kotyledony (fetální kotyledon = jeden úponový klk + soustava jeho volných klků). Placentární septa z bazální ploténky nevyrůstají, ale jsou to neresorbované zbytky *decidua basalis* právě v místech, kde nejsou úponové klky. Na povrch trofoblastového obalu ústí arterie, z nichž tryská krev pod tlakem do prostoru mezi choriové klky, až k choriové membráně. Počet arterií dosahuje jednoho sta a za jednu minutu vtéká do placenty asi 500 ml mateřské krve.

Krev se vrací zpět k bazální ploténce a vtéká do mateřských venul. Placenta se s růstem plodu neustále zvětšuje a na konci těhotenství pokrývá 30% plochy uteru, váží okolo 500-600 g, její průměr je 15 - 25 cm a výška 3 cm. K odloučení placenty od stěny uteru a k jejímu vypuzení dochází asi 30 minut po porodu dítěte (v rámci tzv. třetí doby porodní), (Jelínek et al., 2000).

Placentární bariéra

Placentární bariéra je strukturálně funkční bariéra, která brání mísení fetální a mateřské krve v placentě a umožňuje přestup některých látek mezi oběma krevními oběhy. Mateřskou krev oddělují od fetální krve následující vrstvy (původu embryonálního a fetálního):

1. endotel a bazální membrána kapilár
2. vazivo choriových klků
3. bazální membrána a cytotrofoblast
4. syncytiotrofoblast

Funkce placenty

Výživa a dýchání plodu

Plocha choriových klků je variabilní od 4 do 14 m². Fetus odebírá z mateřské cirkulace 20-30 ml kyslíku za minutu, což vysvětluje proč i krátkodobé přerušení saturace kyslíkem má fatální následek pro fetus. Kromě kyslíku je z mateřské krve do krve zárodku transportována voda, elektrolyty, glukóza, proteiny, tuky, vitaminy, hormony a protilátky. Opačným směrem pak putují kysličník uhličitý a produkty látkové výměny plodu.

Endokrinní funkce

Placenta produkuje hormony, které v dospělosti vylučují hypofýza, ovarium a ledviny. Syntéza hormonů probíhá v choriových klcích a jedná se o: choriový gonadotropin, který se vylučuje močí a využívá se k časné diagnostice těhotenství, somatomammotropin (dříve placentární laktogen). Dále pak choriový TSH, ACTH a FSH, progesteron a estrogeny, oxytocin, vazopresin, relaxin a renin (Jelínek et al., 2000).

Ochranná bariéra

Krev obou krevních oběhů se za normálních podmínek v placentě nemísí a tak vznikl termín - placentární bariéra. Bohužel jako bariéra pro oba krevní oběhy nefunguje sto procentně, což způsobuje v některých případech averzní odpověď mateřského organismu a zvýšené riziko poškození vyvíjejícího se zárodku např. fetální erythroblastosu. V případě, že matka je Rh-negativní a plod Rh-pozitivní a proniknou-li červené krvinky plodu do mateřského organismu, vytvoří se v mateřském organismu protilátky proti nim. Protilátka proti červeným krvinkám plodu pronikne zpět do plodu a začne rozkládat červené krvinky v nadměrném množství. Intenzivní rozklad červených krvinek (hemolýza) vede u plodu k vyplavování mladých forem erytrocytů - *erythroblastosis fetalis* - a k vzestupu hladiny bilirubinu, což je degradační produkt hemoglobinu. Postupující anémie plodu v druhé polovině těhotenství může končit smrtí plodu. Po narození pak vysoké množství uvolněného bilirubinu ohrožuje novorozence toxickým působením na nervovou tkáň. Stupeň poškození plodu lze kontrolovat z amniové tekutiny a provést intrauterinní krevní transfuzi do fétu nebo vyměnit krev plodu ihned po porodu a tím zabránit jeho smrti či poškození mozkových buněk. V lehčích případech lze po porodu snížit hladinu bilirubinu ozařováním novorozence intenzivním světlem modré nebo bílé barvy, což urychluje rozklad bilirubinu v kůži. Běžně se provádí prevence fetální ery-

troblastosy sérem anti-Rh, které je injekčně podáno v průběhu těhotenství matkám se zvýšeným titrem protilátek.

Placenta netvoří účinnou ochranou bariéru bránící průniku cizorodých látek k zárodku, jako jsou léky, alkohol, nikotin, průmyslové chemikálie, bakterie, viry či fyzikální faktory (Jelínek et al., 2000).

Amniová dutina

Amniová dutina se začíná vyvíjet již 7. den po oplodnění jako úzká štěrbina mezi *embryoblastem* a *trofoblastem*. Strop *amniové* dutiny je tvořen jednovrstevným epitelem - plochými *amnioblasty* a později i *extraembryonálním* somatickým *mezodermem* (*mezo-blastem*). Po 4. týdnu vývoje se začíná amniová dutina rozšiřovat, až obklopí celé embryo. Stěna amniové dutiny přechází na ventrální straně do stěny zárodku v místě, které se nazývá kožní pupek. Postranní ohraničující rýhy zárodku stlačují mezi sebou žloutkový vak a zárodečný stvol do společného základu pupečníku (zárodečný stvol = pruh extraembryonálního somatického mezodermu mezi trofoblastem a amniovým váčkem). Primitivní pupečník obsahuje následující extraembryonální komponenty:

- a) stěnu amnia
- b) žloutkový váček + vitelinní cévy
- c) zárodečný stvol
- d) allantois
- e) umbilikální cévy

Pupečník

Prostřednictvím pupečníku komunikuje embryonální coelom s coelomem extraembryonálním a mezi 6. - 10. týdnem vývoje se do tohoto pupečníkového prostoru vsune střevní klička – fyziologická pupečníková hernie. Koncem třetího týdne vývoje komunikace mezi břišní dutinou a extraembryonálním coelomem zanikne.

Během dalšího vývoje se pupečník zužuje a prodlužuje. *Allantois*, vitelinní cévy a žloutkový váček obliterují, a pupečníkem procházejí pouze dvě *arterie* a jedna *vena umbilicalis*. Na povrchu pupečníku je amniový epitel. Mezenchym uvnitř pupečníku, jenž vznikl z extraembryonálního mezodermu *amnia*, žloutkového vaku a zárodečného stvolu, se přemění v rosolovité vazivo.

Při narození je pupečník dlouhý 50 cm (měřeno od kožního pupku k fetálnímu konci placenty) a v průměru měří 2 cm (Jelínek et al., 2000).

Plodové obaly

Zárodek je uložen v amniovém vaku, který leží v choriové dutině. Postupně, jak amniový vak roste, zanikne choriová dutina (celý extraembryonální prostor) a *extraembryonální mezoderm amnia* splyne s *extraembryonálním mezodermem choria*. Tomuto jednotnému plodovému obalu se říká *amniochorion*. Uvnitř *amniochoria* je amniový epitel, zevně pak choriové klky v oblasti *chorion frondosum* a nebo tenká vazivová vrstva v oblasti *chorion laeve*.

Plodový vak

Růst zárodku pokračuje dál, až spolu s přibývajícím amniovou tekutinou vyplní celé *cavum uteri*. *Decidua capsularis* (nad zárodkem) sroste s protilehlou *decidua parietalis* čímž zanikne *cavum uteri*. Plodový obal amniochorion sroste s deciduou a společně pak tvoří plodový vak. Existuje pouze jedno místo v oblasti hrdla děložního, kde zůstává zbytek *decidua capsularis* a *cavum uteri*. S pokračujícím růstem plodu se zvětšuje celý uterus, jenž vyklenuje břišní stěnu (Jelínek et al., 2000).

Amniová tekutina

Amniová tekutina neboli plodová voda, poskytuje během těhotenství optimální prostředí pro vyvíjející se plod a umožňuje mu volný pohyb. Zároveň plod chrání proti nárazům a otřesům, udržuje stálou teplotu a účastní se na transportu některých látek. Ve 2. měsíci vývoje je objem amniové tekutiny 5-10 ml, ve 3. měsíci se zvýší na 100 ml, ve 4. měsíci dosáhne 250 ml. Maximum plodové vody je 38. týden gravidity - 1 litr. Před porodem se pohybuje množství amniové tekutiny okolo 250 ml. Obměna plodové vody probíhá velmi rychle: na konci těhotenství se obmění za dvě hodiny. Plod amniovou tekutinu polyká a ta se dostává, po vstřebání střevem zárodku, do cév plodu a odtud do placenty.

Tvorba amniové tekutiny je dílem jak plodu, tak i matky. Před 20. týdnem těhotenství tvoří hlavní podíl matka, po tomto termínu tvoří hlavní podíl plod. Od 20. týdne těhotenství vylučuje plod do amniové tekutiny také moč. Chemické složení amniové tekutiny je v jednotlivých fázích vývoje plodu dobře známo a lze ho využít k prenatální diagnostice vývojových vad. Plodová voda dále obsahuje buňky embrya (hlavně z pokožky embrya a z urogenitálního traktu), které mohou sloužit k cytologickému vyšetření plodu (k určení chromosomálních vývojových vad, ke zjištění metabolických poruch, pohlaví plodu atd.) (Jelínek et al., 2000).

Imunologický vztah matky a plodu

Vývoj plodu v těle matky představuje výjimku ze zákonů imunologie. Jak mužské pohlavní buňky, tak i později fenotypy zárodku, které jsou odrazem genotypu otce, jsou z hlediska imunologického pro matku cizí. Přesto mateřský organismus nereaguje imunitní averzní reakcí a zárodek neodvrhne. Na vysvětlení tohoto jevu existuje několik hypotéz. Především od začátku implantace leží mezi tkáněmi plodu a matky trofoblast, který patrně tvoří imunologickou bariéru (antigeny trofoblastu jsou zakryty vrstvou mukoproteinu). Dále se soudí, že imunitní reakce těhotné ženy je snížena pouze vůči plodu, ale nikoliv vůči lymfocytům jiných osob. V buňkách trofoblastu a v placentě byla prokázána přítomnost proteinů s imunosupresivním účinkem, které se objevují v plazmě těhotných žen (Jelínek et al., 2000).

3.5 Neplodnost

3.5.1 Ženská a mužská neplodnost

Poruchou plodnosti je postihováno v naší populaci přibližně 20 % párů a představuje významný problém z hlediska psychologického, medicínského, společenského i finančního. Za neplodný se považuje pár po roce neúspěšné snahy o otěhotnění. U některých párů je neplodnost pouze jednostranná, u jiných se problémy kombinují. Asi u 10 % párů zůstává příčina poruch plodnosti i přes nejmodernější diagnostické postupy neobjasněna. Problémy spojené s poruchou plodnosti jsou většinou řešeny pomocí asistované reprodukce (AR).

Ženské faktory neplodnosti:

- Ovariální faktor
- Tubární faktor
- Endometrióza
- Imunologický faktor
- Genetické poruchy

Mužské faktory neplodnosti:

- Nízký počet spermií.
- Nedostatečný pohyb spermií.
- Poruchy morfologické stavby spermií.
- Nepřítomnost spermií v ejakulátu.
- Psychické poruchy spojeny s potížemi s ejakulací nebo impotencí.
- Genetické poruchy.
- Neplodnost po prodělaných infekcích, úrazech či onkologické léčbě.

3.5.1.1 Léčba ženské neplodnosti v programu AR

Stimulace vaječnicků u metod asistované reprodukce

Základem pro léčbu je stimulace ovárií pomocí hormonálních preparátů. Reakce na stimulaci vaječnicků je u jednotlivých žen odlišná a závisí především na věku (reaktivita vaječnicků s věkem klesá). Dále se pak odvíjí od schopnosti dozrávajících vajíček (folikulů) reagovat na stimulaci hormonem gonadotropinem. Mezi gonadotropiny počítáme folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), oba nezbytné pro normální průběh steroidogeneze (produkce pohlavních hormonů) a folikulogeneze (proces dozrávání vajíček). K nim přistupuje ještě choriový gonadotropin (hCG), jehož podání ve stimulačních protokolech nahrazuje ovulační vzestup LH a umožňuje optimální časování léčebného cyklu.

Při léčbě neplodnosti je nezbytná kontrola ovariální hyperstimulace pacientek. Hlavními požadavky hormonální ovariální stimulace je zisk vyššího (ale bezpečného) počtu oocytů, optimální kvalita (zralost) získaných oocytů a minimální zásah do luteální fáze cyklu. Stimulační protokoly asistované reprodukce prodělaly v posledních letech značný vývoj. Zcela se ustoupilo od původní stimulace klomifencitrát + gonadotropiny a v současné době se užívají již jen analoga nebo antagonisté gonadoliberinů (aGnRH) s gonadotropiny (vysoce purifikovaný humánní menopauzální gonadotropin hMG

v kombinaci s FSH - hMG.u.FSH nebo rekombinantní FSH - rec.FSH) spolu s preovulační aplikací hCG. Mezi standard posledních let patří stimulace aGnRH+hMG/FSH+hCG v krátkém, dlouhém nebo ultra krátkém protokolu (Suchá, 2002).

Krátký protokol

Využívá počátečního *flare.up* efektu aGnRH (vzplanutí endogenní sekrece hypofýzou) i gonadotropinů a současně periovulačního supresivního působení analogu na hypofýzu.

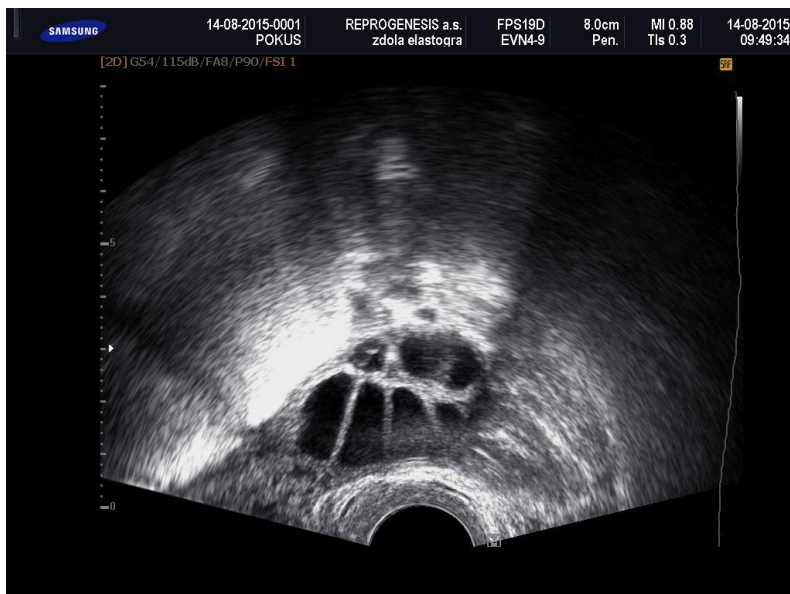
Dlouhý protokol

Využívá supresi hypotalamo, hypofýzo-ovariální osy, tzv. *down* regulaci, která nastupuje při dlouhodobé aplikaci analogu a následně se přidává stimulace gonadotropiny.

Ultra krátký protokol

Užívá se méně často, a sice u tzv. *low responders* (pacientky málo reagující na stimulaci), zde se využívá pouze *flare.up* efektu aGnRH.

Gonadotropiny, dnes užívané pro ovariální stimulaci, jsou buď vysoce čištěné preparáty s FSH získané z moči menopauzálních žen (u.FSH), nebo rekombinantní (rec.FSH) získané genovou manipulací po biotechnologické inkorporaci humánního genu kódujícího syntézu FSH do buněčné linie čínského křečka. Rec.FSH oproti u.FSH preparátům mají vyšší bioaktivitu přes podobnou nebo nižší sérovou imunoaktivní FSH koncentraci, nesou LH aktivitu a mají minimální kontaminaci *non.FSH* proteiny (Suchá, 2002).



Obr. 2: Ultrazvukový obraz nastimulovaného ovária (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2015)

3.5.2 Asistovaná reprodukce

Asistovaná reprodukce (AR) zahrnuje celou řadu embryologických metod, které významně zvyšují úspěšnost léčby.

Cílem AR je nalézt efektivní neinvazivní způsob výběru nejkvalitnějšího embrya.

Cílem AR je přenos jednoho embrya, snížení rizika vícečetného těhotenství, porod доноšeného, zdravého dítěte a snížení nákladů na perinatální péči.

Metody asistované reprodukce zahrnují všechny léčebné postupy a techniky vyžadující manipulaci se zárodečnými buňkami (vajíčky nebo spermii). Poznatky, které byly získány výzkumem fertilizace, se využívají při oplození oocytu in vitro.

3.5.3 Laboratorní techniky IVF

Na počátku byla velkým objevem fertilizace lidského oocytu in vitro a transfer embrya do dělohy (IVF-ET). Louisa Brown, první dítě počaté po oplození metodou IVF – ET, se narodila v roce 1978 v Oldhamu v Anglii. Přestože je jméno Louisy Brownové často spojováno s počátkem IVF, pravdou je, že k prvnímu lidskému IVF -ET vedla dlouhá

cesta, která začala v Edinburghu ve Skotsku již o 20 let dříve. Robert Edwards v roce 1962 popsal stádia zrání lidského vajíčka ve zkumavce. Ve stejné době, tedy v r. 1962, byla také poprvé popsána embryonální kmenová buňka (Edwards, Paul a Cole), která se diferencovala in vitro. První fertilizaci lidského oocyty, který dozrál in vitro, popsal Barry Bavister.

Asistovaná reprodukce se neustále vyvíjí a zdokonaluje. V současnosti metodu IVF - ET velmi úspěšně doplňují tzv. mikromanipulační techniky:

- Intracytoplasmatická injekce spermie (ICSI). Výkon, při kterém je pod mikroskopem vždy jedna spermie zavedena tenkou skleněnou kapilárou přímo do cytoplazmy oocyty.
- Metoda PICSI (intracytoplasmatická injekce preselektované spermie), je vylepšenou modifikací mikromanipulačního oplození pomocí intracytoplasmatické injekce. Modifikace spočívá ve specifické selekci spermií vázajících se na hyaluronový gel, který zajišťuje navázání pouze zralých spermií se schopností specifické vazby na kumulo-oocytární komplex (vazba na kumulární buňky obklopující vajíčko), dále prodloužená kultivace embryí, která umožňuje nejen lepší kontrolu vývoje embryí, ale také následnou selekci a transfer morfologicky nejlepších embryí, které dávají předpoklad vyšší šanci na úspěšnou implantaci.
- Asistovaný hatching (AH), mechanické, chemické či laserové narušení obalu embrya, které usnadní vycestování embrya ze *zona pellucida*, které je nutné před uhnížděním do děložní sliznice (AH poprvé publikoval Cohen et al. v r. 1991).
- Mikrochirurgická aspirace spermií z nadvarlete (MESA), při uzávěru chámovodů (používá se speciální punkční jehla).
- Extrakce spermií z varlete (TESE). Z cca 5-ti milimetrových incisí na varleti se extrahují semenotvorné kanálky, v nichž embryolog při preparaci pod mikroskopem hledá spermie.
- Dalšími speciálními mikromanipulačními technikami je odběr pólového tělíska u zralého oocyty pro genetickou diagnostiku a odběr několika buněk embrya ve stádiu blastocysty pro preimplantační genetickou diagnostiku (PGD) nebo genetický screening (PGS).

- Kontinuální monitoring embryí s možností podrobného sledování vývoje. Tato neinvazivní metoda umožňuje nepřetržité snímání a analýzu embryonálního vývoje bez nutnosti opakovaného hodnocení embryí mimo kultivační prostředí. Objektivní analýza nasnímaného vývoje zajišťuje maximálně efektivní selekci vhodných embryí k transferu a vylučuje embrya s abnormálním vývojem.
- Kryokonzervace gamet a embryí umožňuje jejich dlouhodobé uchování při -196°C v kapalném dusíku.

Dokonalejší techniky asistované reprodukce, kvalitnější média, která umožňují delší kultivaci embryí v laboratorních podmínkách, kvalitnější přístroje, laboratorní vybavení a v neposlední řadě účinnější hormonální přípravky nezbytné k navození růstu a zrání vajíček na vaječnicích ženy, to vše se podílí na zvyšující se úspěšnosti léčby neplodnosti.

Při léčbě pomocí asistované reprodukce – *in vitro fertilizace* (IVF) jsou vaječníky ženy stimulovány pomocí gonadotropinů. Při hormonální stimulaci dochází k růstu více folikulů na obou vaječnicích. Po punkci ovariálních folikulů je možné najít vajíčka (oocyty) v různém stádiu zralosti. Pod mikroskopem je vidět oocyt obklopen kumulárními buňkami (*corona radiata*), (viz obr. 3). Po denudaci (mechanickém očištění vajíčka) se hodnotí zralost oocytu.

Vajíčka, která jsou vhodná pro oplození, se nachází ve fázi MII. Jedná se o oocyt s vyděleným pólovým tělískem v perivitellinním prostoru (viz obr. 6).



Obr. 3: Oocyt obklopený kumulárními buňkami (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2012)

Stádia vajíček (oocytů) získaných po punkci ovariálních folikulů:

GV (Germinal Vesicle) – plně nezralé vajíčko (se zárodečným váčkem).

Zárodečný váček je meioticky nezralý, uprostřed nebo na okraji ooplazmy je sférický, obsahuje velké refraktilní jádérko (*nucleolus*), *ooplazma* – je tmavá, granulovaná a nepravidelného tvaru.



Obr. 4: Nezralý oocyt (fáze GV), (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2012)

GVBD (Germinal Vesicle Break Down) – fáze MI, vajíčko v půli nebo těsně před ukončením procesu dozrání (ve stádiu metafáze I).

Zárodečný váček - již není patrný (došlo k jeho *breakdownu*).

Pólové tělísko - ještě není extrudované.

Ooplazma - jasná a homogenně granulovaná.



Obr. 5: Oocyt ve fázi MI (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2012)

PB (Polar Body) - plně zralé vajíčko s extrudovaným pólovým tělískem s chromosomy ve stadiu metafáze II (MII).

Ooplazma - hladká světle zbarvená.

Zona pellucida má 2 jasné vrstvy: vnější porózní, vnitřní kompaktní.



Obr. 6: Zralý oocyt ve fázi MII (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2012)

3.5.3.1 Intracytoplasmatická injekce spermie (ICSI)

Morfologické abnormality spermií jsou často identifikované u mužů s problematickou fertilitou. Kvalita spermií má zásadní vliv na oplození vajíčka a následný vývoj embrya. Je zde přímý vztah mezi abnormální morfologií spermie a morfologií embrya v pozdějším stádiu dělení (Perinaud et al., 1993). První dva cykly buněčného dělení embrya jsou kontrolovány maternálním faktorem. Paternální efekt nastupuje u embrya

od čtyřbuněčného stádia (Braude et al., 1988). Kvalita DNA u spermií je hodnocena jako absence či výskyt fragmentací v pozdním embryonálním vývoji – late paternal effect (Tesarik et al., 2004, Alikani et al. 2007).

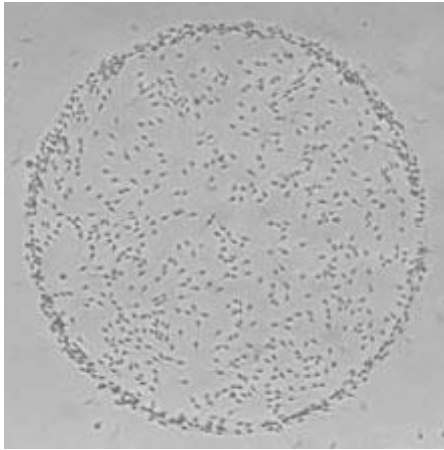
V roce 1992 došlo k prvnímu těhotenství a porodu dítěte po provedení metody ICSI (Palermo et al., 1992). Metoda ICSI přinesla do léčby IVF vyšší úspěšnost u párů s mužským faktorem sterility. Oplození oocytů po ICSI bylo reportováno jako signifikantně vyšší než do té doby používaná metoda SUZI – Subzonal insemination (Van Steirteghem et al., 1993). Mužská infertilita je hodnocena jako oligoasthenoteratozoospermie nebo azoospermie. Metoda ICSI přináší vyšší počet oplozených vajíček a následně i vyšší počet těhotenství, je metodou, kterou lze s úspěchem použít u párů s neobjasněnou příčinou infertility (Aboulghar et al., 1996), hraničními hodnotami spermioqramu (Aboulghar et al., 1995), imunologickou infertilitou (Nagy et al., 1995) a opakovaně neúspěšnou konvenční léčbou in vitro fertilizace (Cohen et al., 1994). Běžnou indikací k metodě ICSI jsou snížené parametry u spermií při hodnocení ejakulátu. Metody ICSI s ejakulovanými spermii může být úspěšně použito u pacientů, kteří mají nízký počet morfologicky kvalitních spermií a nízký počet mobilních spermií v ejakulátu (E. Blahová et al., 2014).



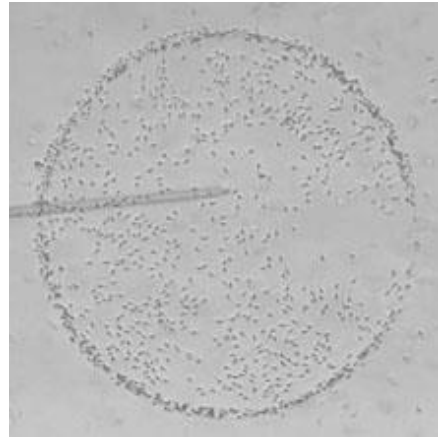
Obr. 7: Intracytoplazmatická injekce spermie do cytoplazmy zralého vajíčka (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2012)

3.5.3.2 Intracytoplazmatická injekce preselektované spermie (PICSI)

Metoda specifické selekce spermií využívá specifických receptorů na hlavičce zralé spermie, které má schopnost vázat se na hyaluronan. U spermií se schopností vazby na hyaluronan byl pozorován nižší výskyt chromozomálních anomálií a lepší integrita DNA. Při výběru spermií pomocí metody PICSI je možné dosáhnout vyšší fertilizace vajíček (oocytů).



Obr. 8a: *Navázané spermie*
(E. Blahová, *ReproGenesis*, 2014)



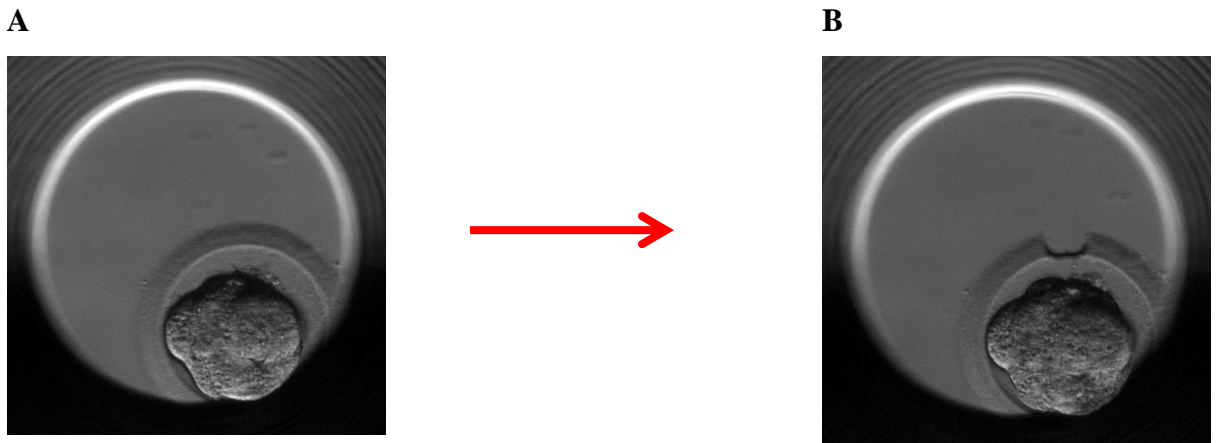
Obr. 8b: *Výběr spermií*
(E. Blahová, *ReproGenesis*, 2014)

3.5.3.3 Asistovaný hatching (AH)

Asistovaný hatching je mikromanipulační technika, kde se mechanicky, chemicky nebo laserem naruší *zona pellucida*. Narušením obalu je usnadněno pro vyvíjející se embryo ve stádiu blastocysty vycestovat ze *zona pellucida* a implantovat se v děložní sliznici.



Obr. 9: *Mechanický asistovaný hatching u třídenního embrya* (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2012)



Obr. 10: *Asistovaný hatching embrya pomocí laseru před (A) a po provedení (B)*
(E. Blahová, *ReproGenesis*, 2015)

3.5.4 Morfokinetika jako vhodný faktor pro výběr embryí

Výběr nejživotascopnějších embryí je klíčovým faktorem v IVF léčbě. Identifikace „top“ embrya s vysokým implantačním potenciálem je stále zpochybňovaným pojmem. Zavedení prodloužené kultivace v *in vitro* podmínkách se ukázalo jako užitečný postup, který umožňuje výběr embryí ve vyšším vývojovém stádiu. Tato embrya mají vyšší šanci na úspěšnou implantaci. Předčasný transfer embryí 2. nebo 3. den kultivace, může vést ke snížení implantačního potenciálu lidských embryí. Transfer pozdějších vývojových fází embryí - blastocyst vede až k dvakrát vyšší úspěšnosti ve srovnání s embryí ve fázi počátečního dělení (Graham et al., 2000; Scholtes a Zeilmaker, 2006).

Prodloužená kultivace embryí může na druhou stranu vést k zrušení léčby z důvodu zastavení vývoje embryí či nevhodné kvality. V klinické studii Walsh et al. (2009) srovnával úspěšnost léčby IVF mezi dvěma skupinami pacientek. Jedna skupina podstoupila přenos třídních embryí, druhá transfer pětidenních embryí ve stádiu blastocyst. Srovnání nenalezlo žádné významné rozdíly mezi těmito dvěma skupinami. Blake et al. (2007) dospěl k závěru, že byl významný rozdíl v živě narozených dětech ve prospěch transferu blastocyst. K těmto závěrům mohou existovat dvě vysvětlení, přenos blastocyst, 5. den kultivace je fyziologicky přirozenější, jde o stádium embryonálního vývoje, které se dostává do dělohy při spontánním početí v nestimulovaném cyklu (Gardner et al., 1998). Pátý den kultivace od oplození oocytu po aktivaci embryonálního genomu může být úspěšnější pro výběr vhodného embrya k transferu do dělohy ženy.

Prodloužená kultivace může vést k přirozenému výběru vhodných embryí, protože abnormální a neživotaschopná embrya v průběhu *in vitro* kultivace svůj vývoj ukončí. I když schopnost zygoty vyvíjet se do blastocysty nemusí nutně odrážet schopnost se implantovat a vyvíjet se zdárně až do porodu zdravého dítěte. Odhad životaschopnosti embrya před přenosem je subjektivní, na základě morfologických znaků. Jeden vhodný postup se opírá o korelaci mezi časným dělením embrya a jeho životaschopnosti (Gonzales et al., 1995). Konvenční klasifikace embryí nemusí zaznamenat jemné rozdíly mezi jednotlivými embryi po čas vývoje jako je načasování progresu vývoje z jednoho stádia do druhého (Arav et al., 2008). Důležitý parametr raného štěpení v závislosti na četnosti klinické gravidity byl poprvé zaznamenán Edwardsem et al. (1984), který jasně poukazuje na souvislost mezi embryi s rychlejší progresí dělení na schopnost embryí lépe se implantovat. Další studie poukazuje na úspěšné použití načasování prvního dělení v léčbě IVF pro identifikaci embryí nejvyšší kvality (Sakkas et al., 1998; Shoukir et al., 1997) a představuje jeden z prvních neinvazivních markerů při výběru embrya s vývojovým potenciálem. Tuto teorii potvrdily i pozdější práce, které poukazují na vyšší úspěšnost v léčbě u žen, která měla embrya s raným dělením (Lundin et al., 2001; Salumets et al., 2003). Další studie potvrzují závěr, že časně se dělící embrya dospějí do stádia kvalitní blastocysty, na rozdíl od embryí s pomalou fází dělení (Fenwick et al., 2002). Ukazuje se, že rychlost dělení koreluje se schopností embrya dosáhnout stádia blastocysty v dobré kvalitě.

Cílem IVF je přenos jednoho embrya s nejvyšší šancí na implantaci, klinického těhotenství a porodu zdravého dítěte. Možnost nepřetržitého sledování vývoje embryí pomocí systému time-lapse, poskytuje cenné informace o kinetických parametrech charakterizujících vývoj embrya. Time-lapse studie vývoje lidských embryí, poukazuje na vztah mezi morfokinetickými parametry, jako jsou vytvoření prvojader (Balaban et al., 2001), či následné druhé nebo třetí dělení a implantací embrya (Lemmen et al., 2008; Racowsky et al., 2011). Wong et al. (2010) zjistil, že vývoj lidského embrya do stádia blastocysty je navázána na časování v časném vývoji během prvního cytoplazmatického dělení z jedné buňky do 2-buněčného stádia, čas mezi 2-buněčným stádiem k 3- až 4-buněčnému stádiu. Na základě této studie autoři dospěli k závěru, že úspěšný vývoj embrya do stádia blastocysty může být předpovězen s pozoruhodnou přesností vycházející z časování raného dělení embrya.

V článku z roku 2011 Meseguer et al. (2011) představil konkrétní časové značky, které souvisí s následnou implantací. Autoři zde hodnotí chronologický vzor buněčného děle-

ní, jakož i další morfologické vlastnosti (velikost buněk a nukleace) v návaznosti na odhalení souvislosti mezi dobou potřebnou k vývoji, při dosažení vývojového milníku a implantačního potenciálu konkrétního embrya. Je identifikován optimální rozsah pro každou morfokinetickou proměnou, která je spojena s podstatně vyšší pravděpodobností implantace. Tato data tvoří základ pro navrhovanou hierarchickou klasifikaci postupu pro výběr nejvhodnějšího embrya pro transfer v každém léčebném cyklu.

3.5.4.1 Monitoring embryí

Možnost kontinuálního pozorování embryí, jejich životaschopnosti a růstového potenciálu je velkým přínosem v embryologické laboratoři (Scott, 2003). Zařízení, které zachycuje vývoj embryí prostřednictvím kamerového systému, je neinvazivní metoda sledování embryí v průběhu jejich kultivace. Je možné shromažďovat kvantitativní a kvalitativní informace o každém embryu, aniž bychom tím narušili kultivační podmínky (Kirkegaard et al., 2012).

Kontinuální snímání vývoje není nová metoda, ale komerční dostupnost této techniky přivedla její zavedení do humánní embryologické praxe. Načasování embryonálního vývoje může být dalším poznatkem pro výběr embrya s nejvyšším vývojovým potenciálem z větší skupiny embryí (Kirkegaard et al., 2012). Bezpečnost techniky byla analyzována ve studii, která srovnávala vývoj embryí, v zobrazovacím systému time-lapse s vývojem v normálním referenčním kultivačním boxu (Cruz et al., 2011). Tato studie dospěla k závěru, že systém time-lapse, nezhoršoval kvalitu ani implantační potenciál embryí. Sekvenční pozorování embryí v různých časových obdobích v průběhu vývoje, může být nápomocno při odhalení aberantní vývojové vady embrya s abnormálním obsahem chromozomů. Z pozorování bylo odvozeno, že životaschopná embrya by se měla řídit předem stanovenou časovou strukturou buněčných dělení. Sekvenční morfokinetika může být úspěšně použita pro identifikaci embryí, které jsou nejvhodnější k transferu (Magli et al. 2007; Azzarello et al., 2012). V současné době lze toto podrobné hodnocení provádět během kontinuálního monitoringu embryí, bez narušení kultivačních podmínek a spolehlivě vyloučit k přenosu embrya, které vykazuje odchylky od normálního vývoje.

Dalším parametrem hodnocení je i čas dělení. Důležitým parametrem vývojového potenciálu embrya je jeho časné oddělení do fáze 2-buněk (tj. 25-27 h po oplodnění). Pomocí kontinuálního monitoringu jsou embrya vizuálně kontrolována 25 až 27 hodin po

oplození pro zjištění, zda první buněčné dělení bylo dokončeno. Několik studií dokumentuje silnou korelaci mezi počátkem dělení a následného rozvoje potenciálu jednotlivých embryí (Lundin et al., 2001; Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 2001; Sakkas et al., 1998; Fenwick et al., 2002; Van Montfoort et al., 2004). Všechny uvedené studie se shodují na korelaci mezi časným dělením embrya, životaschopnosti a následné implantaci. Naopak embrya, která se dělí později, vykazují nižší životaschopnost a úspěšnost implantace.

Spolehlivý výběr životaschopných embryí pro transfer je klíčovým faktorem při stanovení úspěšnosti léčby IVF. I přesto stále neexistují stoprocentně spolehlivé metody k identifikaci embrya s vysokým vývojovým potenciálem. Prodloužená kultivace embryí v laboratorních podmínkách až do pátého dne se ukázala jako užitečná metoda, která umožní výběr embryí ve vyspělejších stádiu. Tato embrya dávají vyšší pravděpodobnost úspěšného výsledku v podobě klinické gravidity.

4 MATERIÁL A METODIKA

Studie byla provedena na klinice reprodukční medicíny ReproGenesis Brno v období od března 2012 do prosince 2014. Klinika ReproGenesis má povolení k činnosti tkáňového zařízení vydané Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). Je specializovaným pracovištěm pro léčbu poruch plodnosti.

Všechny postupy a protokoly byly provedeny v souladu se zákonem č.296/2008 Sb. a vyhlášky č.422/2008 Sb. o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka. Studie byla provedena v dárcovském programu IVF za použití darovaných vajíček (oocytů). Dárkyně byly zařazeny do programu dárcovství vajíček na základě postupů, které se řídí zákonem 296/2008 Sb. a vyhlášky 422/2008 Sb. Tyto zákony spadají do společné Evropské tkáňové direktivy (European Tissue Directives 2004/23/ES) a jsou kontrolovány SÚKLeM.

Průměrný věk dárkyň oocytů byl $25,5 \pm 2,82$ let, průměrný věk příjemkyň oocytů byl $43,9 \pm 2,89$ let. Do studie byly zařazeny jen ty páry, kde muž vykazoval normální hodnoty spermogramu (WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 2010).

Při odběru bylo získáno 352 dárcovských oocytů v metafázi II. Všechny oocyty byly oplodněny pomocí intracytoplazmatické injekce spermie do oocyty (ICSI). K oplodnění byly použity spermie partnerů příjemkyň. 268 oocytů normálně fertilizovalo a 206 embryí bylo následně v průběhu pětidenní kultivace *in vitro* analyzováno, pomocí metody time-lapse v přístroji Embryoscope. Čtvrtý den kultivace byl u embryí proveden asistovaný hatching. Embrya byla transferována 5. den kultivace (cca 120 hodin od fertilizace oocyty). Transferováno bylo jedno nebo dvě embrya. Počet embryí k transferu byl určen na základě přání páru s přihlédnutím na zdravotní anamnézu a věk ženy. Do souboru byly zařazeny jen pacientky s průkaznou implantací embrya/-í. V případě, že se transferovala dvě embrya a při ultrazvukové kontrole bylo verifikováno jen jedno embryo, byla pacientka ze studie vyřazena.

4.1 Příprava příjemkyň oocytů

Pro synchronizaci cyklu dárkyně a příjemkyně byla v přípravě použita hormonální antikoncepce. V transferovém cyklu byla příprava endometria příjemkyně vedena pomocí estrogenů (Progynova; Bayer, Berkshire, Velká Británie) a GnRH antagonisty (Orgalutran; Organon, Dublin, Irsko) s doplněním progesteronu (Utrogestan; SEID, S.A., Barcelona, Španělsko) v luteální fázi.

4.2 Ovariální stimulace dárkyň oocytů

Dárkyně byly mladé ženy bez genetické zátěže v rodině, normálního karyotypu, negativní na pohlavně přenosné choroby, vyšetření bylo provedeno v souladu se zákonem č.296/2008 Sb. a vyhlášky č.422/2008 Sb. Všechny dárkyně měly normální menstruační cyklus v délce 26 – 34 dní, normální hmotnosti. Dva měsíce před stimulací neuváděly žádnou endokrinní léčbu. Fyziologickou dělohu a vaječníky, které nevykazovaly příznaky syndromu polycystických ovárií, vše zkontrolováno transvaginální sondou.

Dárkyně byly stimulovány rekombinanatní FSH (Gonal-F, MerckSerono, Madrid, Španělsko) spolu s aGnRH (Cetrotid, antagonisté gonadoliberinů Merck Serono, Madrid, Španělsko). Ultrazvuková kontrola byla zahájena 6. den stimulace a prováděna následujících 48 hodin pro monitoring růstu folikulů. Denní dávka FSH byla stanovena na základě sérových hladin estradiolu a počtu a velikosti folikulů na základě transvaginální

sonografie. Pokud minimálně 6 nejrychlejších folikulů dosáhlo průměru 20 mm, byl subkutánně podán GnRH agonista (Decapeptyl, Ferring GmbH, Kiel, Německo). Transvaginální odběr oocytů (oocyte pick-up, OPU) byl naplánován za 36 hodin po podání.

4.3 Punkce ovariálních folikulů

Folikuly byly aspirovány transvaginální punkční jehlou (COOK, Austrálie), folikulární tekutina byla nasávána do sterilních zkumavek (Nunc, Dánsko) a poté vylévána do sterilních Petriho misek (Nunc, Dánsko). Pod 100-násobným zvětšením pomocí stereomikroskopu (Nikon SMZ 1500, Japonsko) byly oocyty vyhledávány. Nalezené oocyty byly pomocí skleněné sterilní pipety (Origio, Dánsko) přeneseny a opláchnuty v manipulačním médiu G-MOPSTTMPlus (Vitrolife, Švédsko) ve sterilních Petriho miskách (Nunc, Dánsko). Následně byly umístěny do sterilních kultivačních misek (Nunc, Dánsko) v inkubátoru Heracell (Thermo Scientific, USA) při 37°C, 5% O₂, 6% CO₂. Zde byly kultivovány 4 hodiny před denudací (mechanické očištění oocytů od kumulárních buněk). Oocyty byly denudovány k ověření jejich zralosti a kvality a následné přípravy k metodě ICSI. Vyhledávání oocytů a jejich manipulace byla prováděna v laminárním boxu (IVFtech, Dánsko), aby byla zajištěna čistota prostředí a optimální teplota.

4.4 Denudace oocytů

Očištění vajíček bylo provedeno na sterilní Petriho misce (Nunc, Dánsko) mechanickým pipetováním pomocí sterilní denudační pipety (Microtech, Česká republika) v roztoku hyázy (HyaseTM, Vitrolife, Švédsko) a následně v manipulačním médiu (G-MOPSTTMPlus, Vitrolife, Švédsko) překryté parafinovým olejem (Ovoil, Vitrolife, Švédsko). Denudace probíhala v laminárním boxu (IVFtech, Dánsko) za použití stereomikroskopu (100x, Nikon SMZ 1500, Japonsko). Následně po mechanickém očištění byla zhodnocena morfologie a zralost oocytů. Oocyty, které vykazovaly dobrou morfologickou kvalitu a nacházely se ve fázi MII (plně zralý oocyt s vyděleným pólovým tělískem) byly použity k metodě ICSI.

4.5 Vyhodnocení spermioqramu a příprava spermií před metodou ICSI

Ejakulát obsahující spermie byl získán masturbací po 3 až 5-denní pohlavní abstinenci, odebraný do sterilní kádinky se nechal po dobu třiceti minut zkapalnit ve vyhřívacím boxu (Heraeus, Německo) při teplotě $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Po zkapalnění byl ejakulát vyhodnocen dle standardních postupů WHO (World Health Organisation: WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 2010).

Spermie pro metodu ICSI byly připraveny metodou swim-up (Enginsu et al., 1993) v médiu Sperm medium (Vitrolife, Švédsko). Takto připravené spermie byly uloženy do inkubátoru Heracell (Thermo Scientific, USA) při 37°C , 5% O₂, 6% CO₂ pro následné použití k metodě ICSI.

4.6 Embryologické metody

Metoda ICSI

Metoda ICSI byla provedena na invertovaném mikroskopu (Olympus, USA) s využitím mikromanipulátoru Research Instruments (RI, Velká Británie) a injektorů Eppendorf (Eppendorf, Německo). Za použití Holdingové (fixační) ICSI pipety (injektující) a skleněné sterilní pipety (Microtech, Česká republika). Pro metodu ICSI byla použita média: G-IVF™ (Vitrolife, Švédsko) pro oocyty a médium ICSI™ (Vitrolife, Švédsko), viskózní roztok pro mikromanipulaci se spermiemi obsahující polyvinylpyrollidone (PVP) pro spermie. Do mikrokapek G-IVF™ (Vitrolife, Švédsko) o objemu 10 μl byly jednotlivě umístěny oocyty a do jedné mikrokapky s médiem ICSI™ (Vitrolife, Švédsko) bylo injektováno 2 μl suspenze spermií. Spermie byly při zvětšení 400x za použití Hoffmannova modulačního kontrastu selektovány, imobilizovány, nasáty do ICSI pipety a vpraveny do cytoplazmy oocytů.

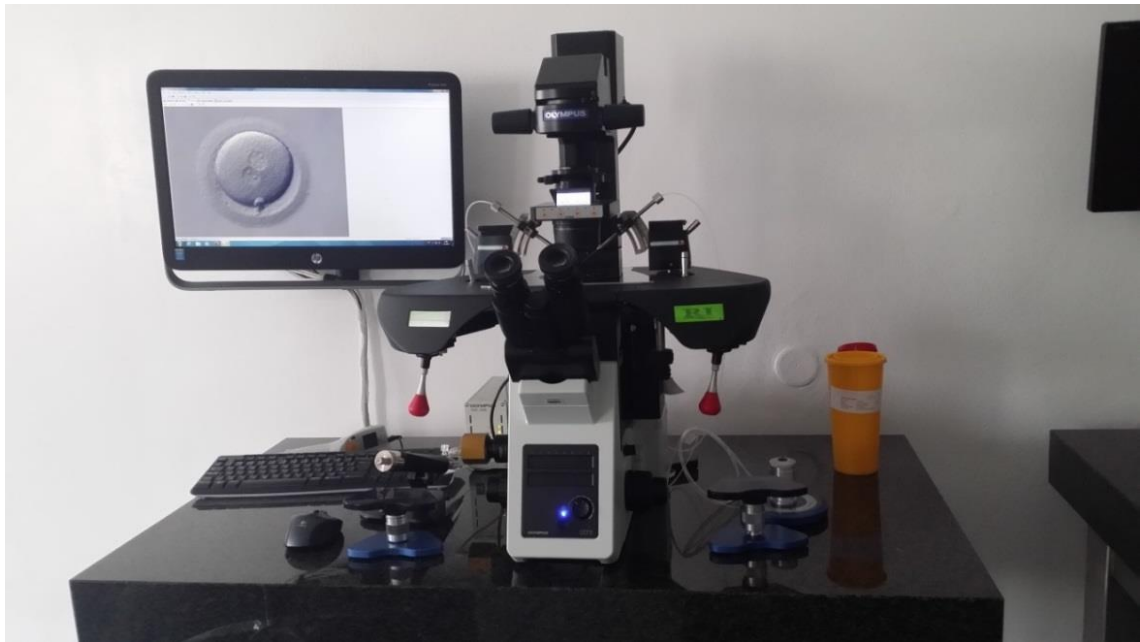
Před vpichem spermie do oocytu byla hodnocena morfologická stavba spermií – hlavička, krček, bičík, případná přítomnost vakuol v hlavičce spermie.

Po ICSI byly oocyty byly jednotlivě vloženy do předem ekvilibrovaných sterilních kulturačních misek - embryo-slide (EmbryoSlide, UnisenseFertiliTech, Aarhus, Dánsko) obsahující 12 kapek média G-1™ (Vitrolife, Švédsko), které je určeno pro kultivaci

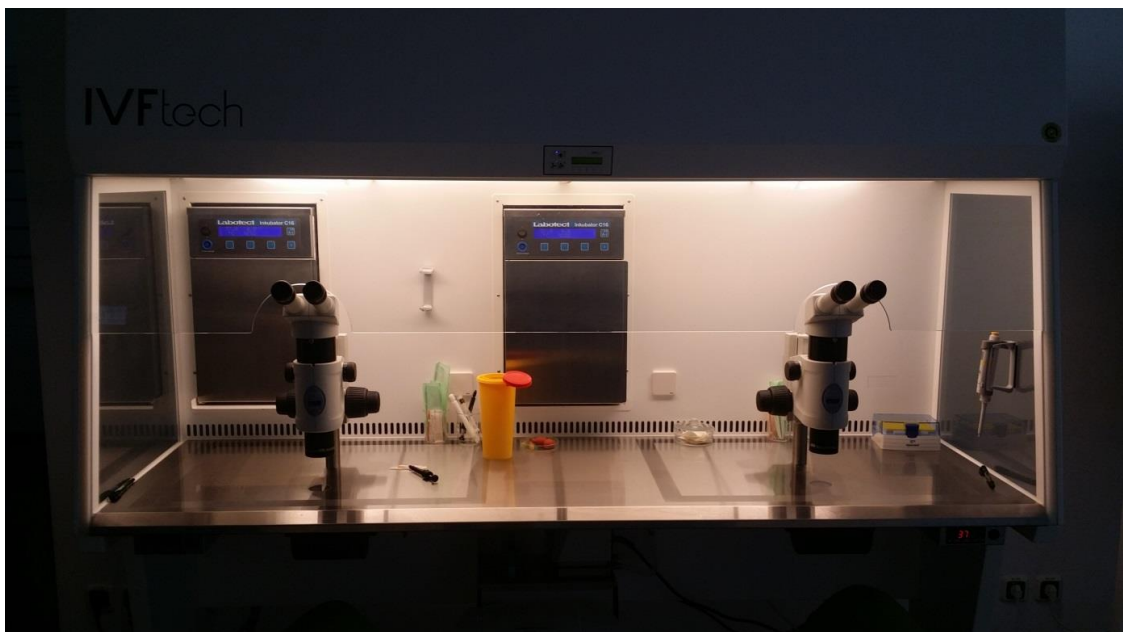
embryí do 3. dne v podmínkách *in vitro* o objemu 20 μ l a překryté minerálním olejem k prevenci evaporace o objemu 1,4 ml (SAGE, BIO CARE Evropa, Itálie). Ekvilibrace média probíhala 24 hodin předem pro ustálení média (inkubační podmínky: 37°C, 5% O₂, 6% CO₂) v přístroji EmryoScope (UnisenseFertiliTech, Dánsko), kam byly embryoslidy přeneseny pro začátek časoběrného snímání následného vývoje embryí. Jako indikátor fertilizace bylo stanoveno objevení dvou pronukleárů a dvou pólových tělísek. Všechny fertilizované oocyty byly dále hodnoceny pomocí softwaru, kterým je vybaven EmbryoScope.



Obr. 11: *Metoda ICSI (E. Blahová, ReproGenesis, 2013)*



Obr. 12: Mikromanipulátor Research Instruments (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2014)



Obr. 13: Laminární box pro manipulaci se zárodečnými buňkami a embryi (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2014)



Obr. 14: Kultivační boxy pro uchování zárodečných buněk před ICSI (E. Blahová, *ReproGenesis*, 2014)

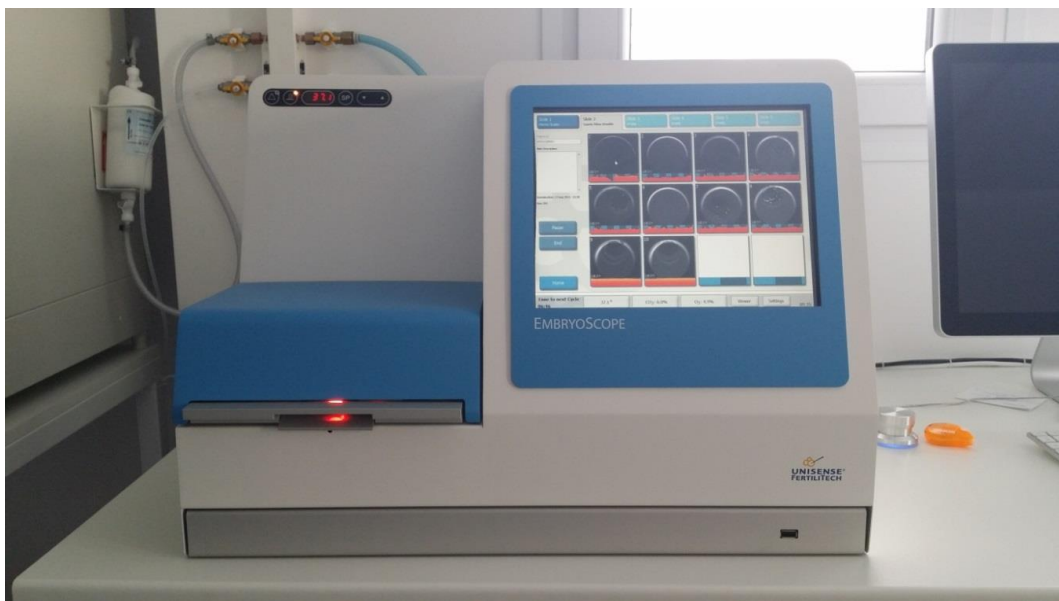
4.7 Kultivace a hodnocení embryí

Kultivační systém EmbryoScope (ES)

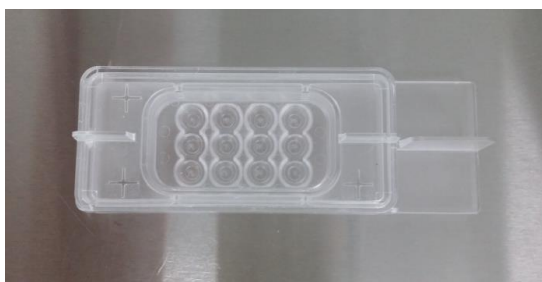
Kultivační systém EmbryoScope (UnisenseFertiliTech, Dánsko) používá zobrazovací techniku s nízkou intenzitou červeného světla (635 nm) z jedné světlo emitující diody s krátkým časem osvětlení (30 ms) na jeden snímek (Oh et al., 2007; Ottosen et al. 2007). Optika obsahuje modifikovaný Hoffmannův kontrast se speciálním objektivem 20x s dlouhou pracovní vzdáleností (LWD, Leica, Wetzlar, Německo) pro optimální světelnou citlivost a rozlišení pro červené vlnové délky. Digitální obraz byl získáván vysoce citlivým monochromatickým CCD fotoaparátem (1280 × 1024 pixelů na obrázek). Konečné zvětšení výsledného digitálního snímku zobrazeného na obrazovce počítače záviselo na velikosti zobrazovaného obrazu. Obraz embrya byl přenesen na obrazovku počítače pomocí speciálního softwaru pro obrazovou analýzu EmbryoViewer (UnisenseFer-

tiliTech, Dánsko). Jednotlivá embrya se zobrazovala na ploše 27 x 27 cm. Zvětšení v této velikosti se blíží hodnotě 1000x. Obraz vyvíjejícího se embrya byl pořízen každých 15 minut v sedmi stejně vzdálených rovinách ostrosti v rozlišení 1000 x 1000 pixelů, a to nepřetržitě až do transferu embryí (až 120 hodin po oplození).

Intenzita světla v ES byla mnohem nižší, než je intenzita světla v mikroskopech, které se standardně používají při kontrole vývoje embryí na IVF klinikách. Spektrální složení světla v ES bylo omezeno na úzký rozsah soustředěný kolem 635 nm. Je prokázáno, že nižší vlnové délky světla < 550 nm inhibují vývoj embrya (Oh et al., 2007).



Obr. 15: Kultivační systém EmbryoScope (E. Blahová, ReproGenesis, 2014)



Obr. 16: Kultivační miska Embryoslide v systém EmbryoScope (E. Blahová, ReproGenesis, 2014)

Kultivace embryí

Fertilizované oocyty byly kultivovány po dobu 5 dní v podmínkách *in vitro*. Pro kultivaci embryí byla použita sekvenční média Vitrolife (Vitrolife, Švédsko).

Hodnocení embryí

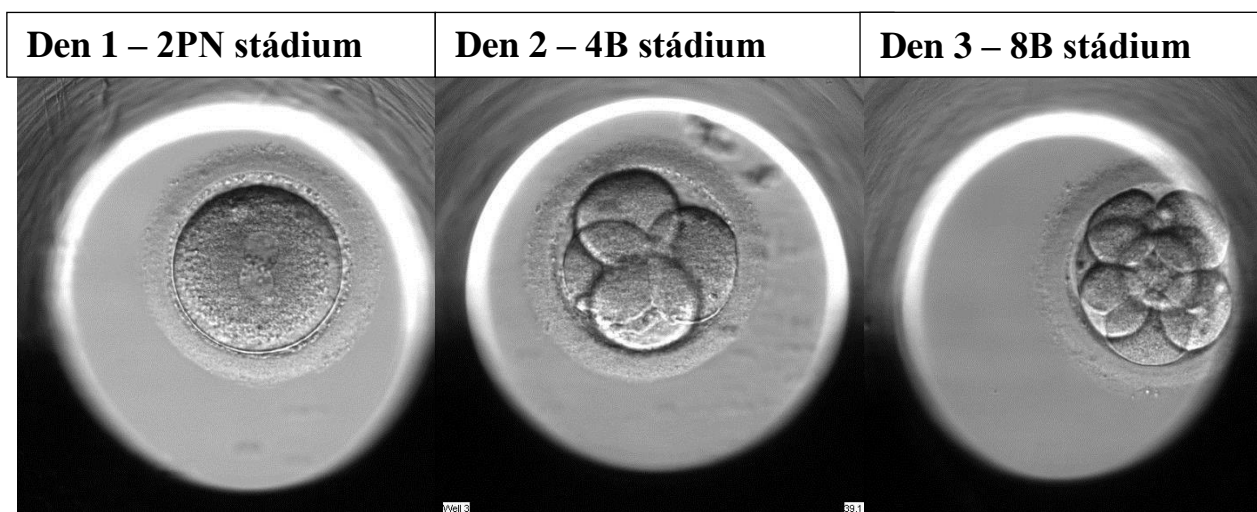
Úspěšnost fertilizace byla hodnocena po 16 – 19 h od provedení metody ICSI. Morfologie kultivovaných embryí byla hodnocena den 2 (44 - 48 h po ICSI), den 3 (64 - 72 h po ICSI), den 4 (90 - 94 h po ICSI). Parametry, pro hodnocení zahrnovaly: počet buněk, symetrie a granulace, typ a procento fragmentace, přítomnost multinukleací v blastomerách a stupeň kompaktace, hodnocení dle Alikani et al. (2000).

Blastocysty byly hodnoceny den 5 (po 120 hodinách od injekce spermie) v závislosti na expanzi blastocelové dutiny a utvořené (integrita) *inner cell mass* (ICM) a *trophectodermu* – *trophectodermcells* (TE). Po vytvoření expandované blastocoelové dutiny bylo možné řádné vyhodnocení ICM a TE až po 120 hodinách od ICSI (Alicani et al., 2000). Za embrya dobré kvality byly považovány blastocysty, které měly vytvořen soudržný tvar TE skládající se z mnoha buněk ve tvaru srpků a ztuhnutí ICM. Pro hodnocení embryí byl použitý systém hodnocení pro blastocysty dle konsensu ALPHA/ESHRE (AlphaScientists, 2011), které vymezují hodnocení pro morfologicky optimální nebo dobré blastocysty.

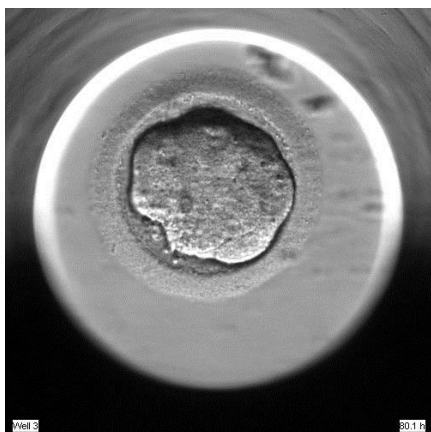
Hodnocení embryí v průběhu kultivace od druhého do čtvrtého dne

Tab. 1: *Hodnocení embryí v průběhu kultivace od druhého do čtvrtého dne*

STUPEŇ	DEN 2	DEN 3	DEN 4
A	≥ 4 blastomery fragmentace 0 - 10%	≥ 6 blastomer fragmentace 0 – 10%	Částečná/kompaktní morula fragmentace 0 – 10%
B	≥ 4 blastomery fragmentace 10 - 25 %	> 6 blastomer fragmentace 10 -25%	Částečná/kompaktní morula fragmentace 10 – 25%
C	< 4 blastomery fragmentace 0 – 10%	4-6 blastomer fragmentace 0 – 10%	≥ 8 blastomer fragmentace 0 – 10%
D	Nerýhovaná embrya ≤ 4 blastomery fragmentace 10 – 25% embryo s fragmentací nad 25%	< 4 blastomery bez ohledu na frag. 4-6 blastomer fragmentace 10 – 25% embryo s fragmentací nad 25%	< 8 blastomer bez ohledu na frag. ≥ 8 blastomer fragmentace 10 – 25%. embryo s fragmentací nad 25%



Den 4 – Kompaktovaná morula



Obr 17: Vývoj embryí od 1. do 4. dne kultivace
(E. Blahová, *ReproGenesis*, 2012)

Hodnocení embryí v průběhu kultivace pátý den

Tab. 2: *Konsenzus hodnotícího systému blastocyst (AlphaScientists, 2011)*

	Kvalita	Hodnocení	Popis
Stádium vývoje	1		<i>časná blastocysta</i>
	2		<i>blastocysta</i>
	3		<i>expandovaná blastocysta</i>
	4		<i>hatchující blastocysta</i>
ICM	1	dobrý	<i>výrazný, snadno rozpoznatelný, zhuštěné množství buněk</i>
	2	přiměřený	<i>snadno rozpoznatelný, s mnoha buňkami volně seskupenými</i>
	3	slabý	<i>obtížně rozeznatelný, velmi málo buněk</i>
TE	1	dobrý	<i>mnoho buněk formovaného kohezivního epitelu</i>
	2	přiměřený	<i>málo buněk formovaného epitelu</i>
	3	slabý	<i>velmi málo buněk</i>

ČB (časná blastocysta)

- *blastocel* (tekutinou naplněná dutina) je menší než půlka velikosti embrya.

B (blastocysta)

- *blastocel* je stejný nebo větší než půlka velikosti embrya.

EB (expandovaná blastocysta)

- *blastocel* vyplňuje celé embryo, dochází k zvětšení embrya a ztenčení zony pelucidy.

HB (hatchující blastocysta)

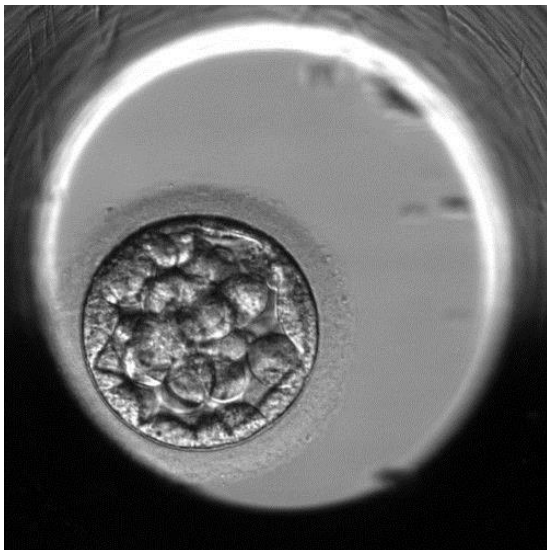
- embryo již opouští obal *zona pellucida*

Blastocel rozdělí buňky do dvou skupin:

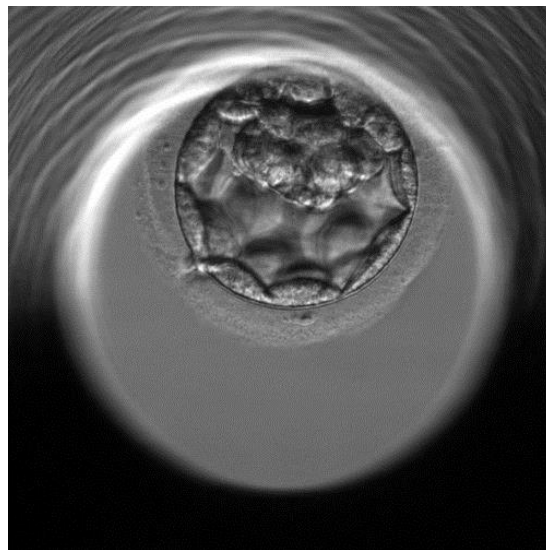
- ***Inner cell mass (ICM, vnitřní buněčná masa)*** - základ vlastního embrya

- ***Trophectoderm (TM, trofektoderm)*** – vývoj extraembryonálních struktur

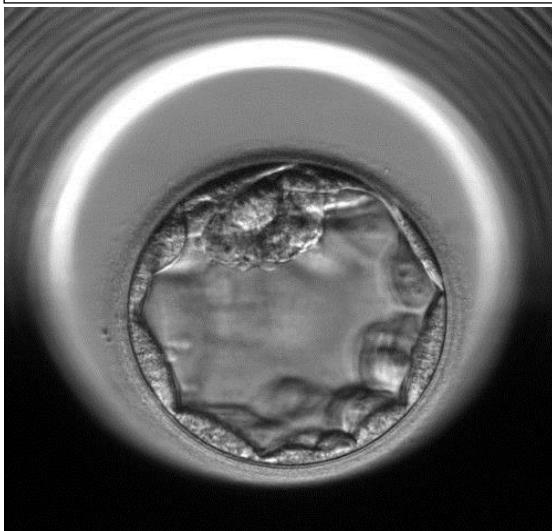
Den 5 - Časná blastocysta



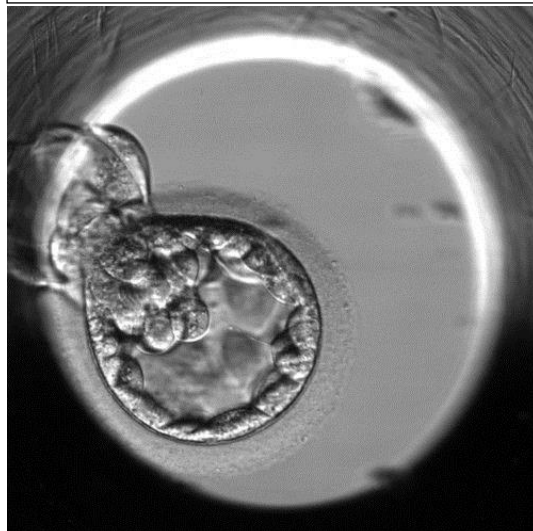
Den 5 - Blastocysta



Den 5 – Expandovaná blasto-



Den 5 – Hatchující blastocysta



Obr. 18: *Hodnocení blastocyst dle stádia (E. Blahová, ReproGenesis, 2013)*

Hodnocení časosběrných snímků

Analýza získaných obrázků každého embrya byla provedena na externím počítači se speciálním softwarem pro EmbryoViewer (UnisenseFertliTech, Dánsko). Pomocí softwaru byl analyzován obraz embrya se záznamem všech vývojových událostí po ICSI. Při použití softwaru EmbryoViewer bylo stanovené přesné načasování buněčného dělení a stanoveny další parametry vývoje:

- čas dělení embrya do 2-buněčného stádia t2
- čas dělení embrya do 3-buněčného stádia t3
- čas dělení embrya do 5-buněčného stádia t5

Čas dělení byl definován jako moment, kdy došlo ke kompletnímu rozdělení buněk. Znamená to, že při prvním dělení byly dvě nové dceřiné buňky kompletně segregovány a byla uzavřena jejich vlastní cytoplazmatická membrána.

Rovněž byly stanoveny časové proměnné vztahující se k buněčnému dělení, době trvání buněčného cyklu. Označení cc2 (t3 - t2), označení času, kdy embryo setrvalo ve 2- buněčném stádiu k vydělení do 3-buněčného stádia a s2 (t4 - t3) stádium k synchronizaci obou blastomer na 4-buněčné embryo (období, kdy embryo z 3-buněčného stádia dosáhlo 4-buněčného). Pro hledání potenciálních markerů pro predikci konečného procenta blastocyst, úspěšné implantace a porodu, byly hodnoceny časové proměnné t2, t3, t5, cc2 a s2 a následně srovnány s doporučeným optimálním časovým rozpětím, které bylo navrženo Meseguerem et al. (2011).

Optimální načasování dle Meseguera et al. (2011):

t2, 24,3 – 27,9 h

t3, 35,4 – 40,3 h

t5, 48,8 – 56,6 h

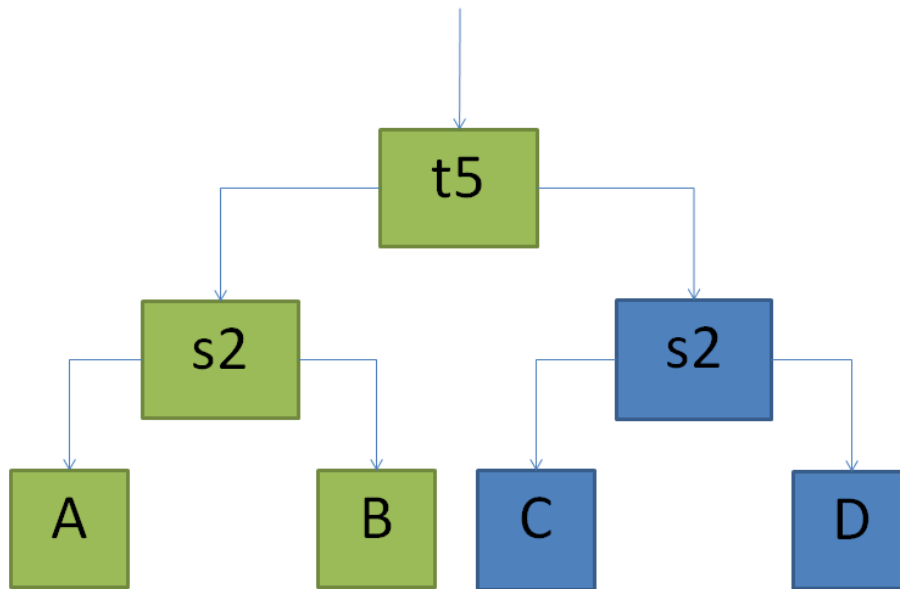
cc2, <11,9 h

s2, <0,76 h

Morfokinetické kategorie

V článku Meseguer et al. (2011) vytvořil základ pro hierarchii klasifikace postupů pro výběr životaschopných embryí na základě morfokinetických parametrů, které jsou charakteristické v časném embryonálním vývoji. Prvním krokem je rozdělení všech hodnocených embryí do čtyř kategorií s klesajícím implantačním potenciálem od třídy A po třídu D. Výběr byl primárně hodnocen podle časové proměnné t5 a sekundární proměnné s2. V případě, že hodnota t5 byla v optimálním časovém rozsahu (48,8 až 56,6 h), embryo bylo hodnoceno jako A nebo B. V případě, že hodnota t5 klesla mimo optimální rozsah, bylo embryo vyhodnoceno jako C nebo D. Pokud s2 byla v optimálním rozsahu ($\leq 0,76$ h) bylo embryo hodnoceno jako A jestliže zároveň t5 bylo v optimálním rozsahu a C pokud t5 bylo mimo optimální rozsah. Stejně tak pokud $s2 > 0,76$ h, embryo bylo

hodnoceno jako B jestliže bylo t5 v optimálním rozsahu a D jestliže t5 bylo mimo optimální rozsah. Z této klasifikace se dá očekávat, že embrya s klasifikací třídy A budou mít nejvyšší míru implantace, nejnižší třída D a středním hodnotám přísluší třída B a C (viz obr 19).



Obr. 19: Hierarchická klasifikace embryí

4.8 Transfer embryí

Transferováno bylo jedno nebo dvě embrya, vždy bylo přihlédnuto k zdravotní anamnéze, věku příjemkyně a přání léčeného páru. Další embrya byla zmrazena pro potenciální budoucí transfer pomocí standardní vitrifikační technologie (Cobo et al., 2010). Hodnota β -hCG byla stanovena 14 dnů po přenosu embryí. Klinické těhotenství bylo potvrzeno přítomností gestačního vaku se srdeční akcí při ultrazvukovém vyšetření po 8 týdnech těhotenství.

5 VÝSLEDKY

5.1 Analýza dat

Sledovaná embrya byla rozdělena do dvou skupin podle parametru, zda se vyvinula 5. den do stádia blastocysty nebo ne. Dále, zda se jednalo o blastocysty dobré nebo špatné kvality. Embrya, která dosáhla stádia blastocysty, byla hodnocena, jak bylo popsáno výše. Následně byla zhodnocena míra implantace a následného porodu. Všechny hodnoty byly statisticky zpracovány. Analýza dostupných dat byla rozdělena do 4 skupin.

V první skupině je ukázána grafická analýza celého sledovaného souboru. Vždy nejdříve orientační sloupcový graf pro určení normality, poté rozložení časů vzhledem k předdefinovaným hraničním hodnotám.

Ve druhé skupině je provedena analýza pro sledované koncové body - blastocysta, GMB (blastocysta dobré kvality), implantace a živě narozené děti - a stanovované časy. Každý koncový bod má 2 možné výstupy: 1 (přítomnost) a 2 (nepřítomnost). Vždy jsou porovnávána nejprve reálná, naměřená data a následně srovnání s časy v optimálním rozmezí navržené Meseguerem et al. (2011). K první skupině analýz je použit Mann-Whitney U-test a krabicové grafy, ke druhé, Fisher exact test a sloupcové grafy. Vzhledem k tomu, že se provádí vždy více testů najednou (konkrétně 5 pro 5 různých časů), bylo nutné pro signifikaci provést korekci na mnohonásobné srovnání. Byla použita Bonferroniho korekce a hladina $\alpha = 0.05$ snížena na $0.05/5$ (počet testů) = 0.01, za významné lze považovat ty testy, kde je $p \leq 0.01$.

Ve třetí skupině je uvedeno grafické vyjádření procent jednotlivých výstupů (u implantace a živě narozených dětí) z celku a z počtu blastocyst (tj. blastocysta = 1).

Ve čtvrté skupině je zhodnocena asociace hodnocení vývoje (4 skupiny A, B, C a D) s jednotlivými koncovými body (blastocysta, GMB, BMB – blastocysta špatné kvality, implantace a živé narození). K celkovému zhodnocení byl použit Pearsonův χ^2 -test, při signifikantním výsledku ($p \leq 0.01$) byl dále následován sérií Fisher exact testů

pro zjištění, mezi kterými skupinami se nachází rozdíl. I zde je třeba použít Bonferroniho korekci, protože každá série má 6 testů, tak $\alpha = 0.05/6 = 0.0083$, tedy za významné považovat ty testy, kde $p \leq 0.0083$.

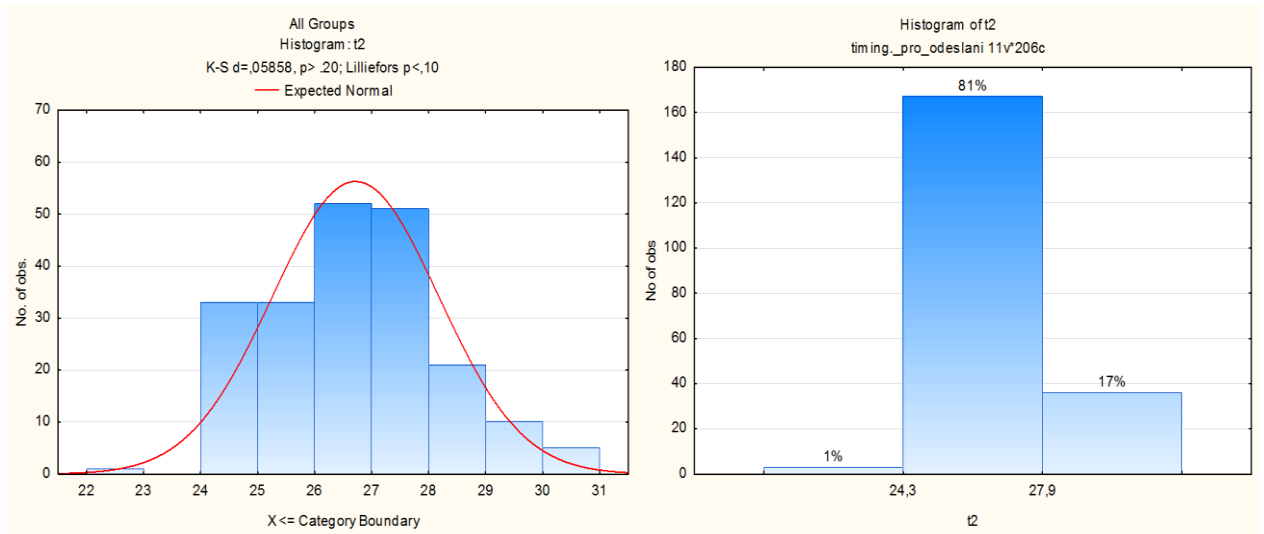
Z 83 transferovaných blastocyst se 39 úspěšně implantovalo (potvrzený gestační váček se srdeční akcí na ultrazvuku). Výsledné procento implantace bylo 47,0 %. Po úspěšné implantaci pokračovalo ve vývoji, který byl ukončen porodem donošeného dítěte, 30 embryí. Celkový počet živě narozených dětí 36,1 %.

5.2 Hodnocení sledovaného souboru

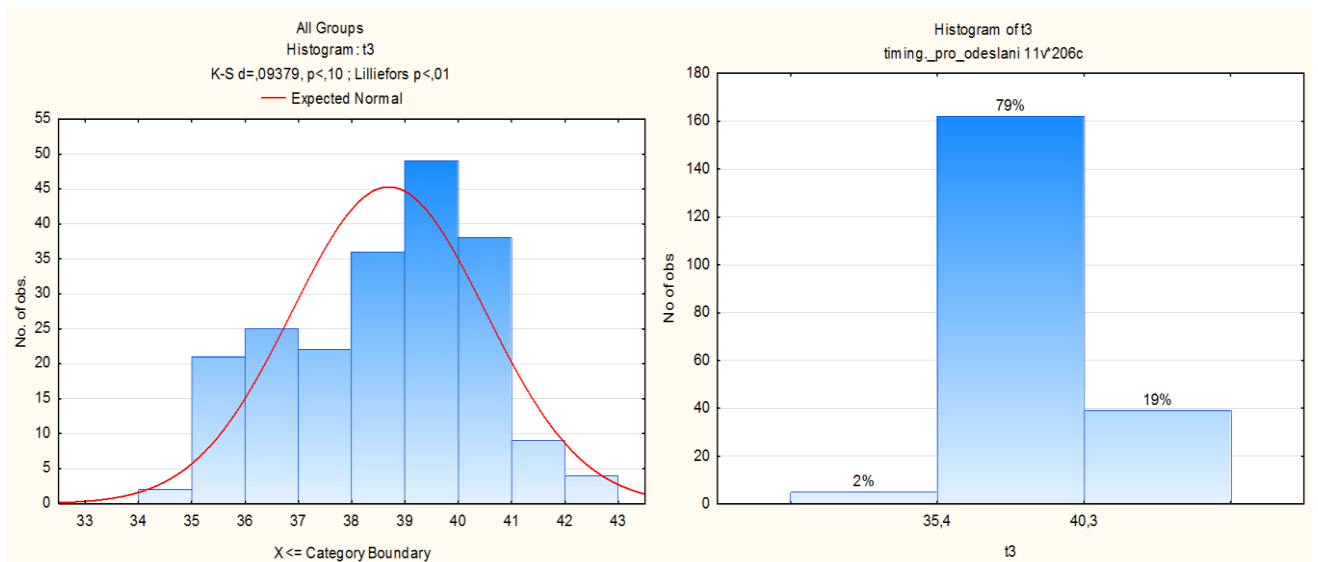
Hodnocení celého souboru je znázorněno graficky. Ke každé časové proměnné je vždy znázorněn graf celého souboru a poté srovnání jednotlivého procentuálního zastoupení embryí v předdefinovaných optimálních časech dle Meseguera et al. (2011), viz grafy 1 až 5.

V grafickém znázornění celého souboru (viz grafy 1 až 5) u daných časových proměnných je na ose x vyznačen čas dělení embryí v čase t a na ose y procentuální zastoupení embryí. V grafickém znázornění s konkrétní časovou proměnnou (viz grafy 6 až 15) je na ose x vyznačen čas dělení embryí a na ose y počet embryí. Ve sledovaném souboru embryí v čase t_2 (čas dělení embrya do 2-buněčného stádia) bylo 81 % embryí v optimálním časovém rozmezí (24,3 – 27,9 h), 17 % embryí se vyvíjelo pomaleji a 1 % embryí bylo ve svém vývoji rychlejší (viz graf 1). V souboru embryí v čase t_3 (čas dělení embrya do 3-buněčného stádia) bylo 79 % embryí v optimálním časovém rozmezí (35,4 – 40,3 h), 19 % embryí bylo ve svém vývoji pomalejší a 2 % embryí měly vývoj rychlejší ve srovnání s optimálním rozmezím (viz graf 2). Soubor embryí v čase t_5 (čas dělení embrya do 5-buněčného stádia) byl zastoupen z 51 % v optimálním časovém rozmezí, 13 % embryí bylo pomalejší a 35 % embryí mělo rychlejší vývoj (viz graf 3). V souboru embryí v čase cc_2 (označení času, kdy embryo setrvávalo ve 2-buněčném stádiu k vydělení do 3-buněčného stádia) bylo 36 % embryí v optimálním časovém rozmezí ($cc_2 < 11,9$ h) a 64 % embryí mělo vývoj pomalejší (viz graf 4). V souboru embryí označený časovou proměnnou s_2 (označení času, kdy u embrya došlo k synchronizaci obou blastomer na 4-buněčné embryo) bylo 73 % embryí v optimálním časovém rozmezí ($s_2, < 0,76$ h) a 27 % embryí s pomalejším vývojem (viz graf 5).

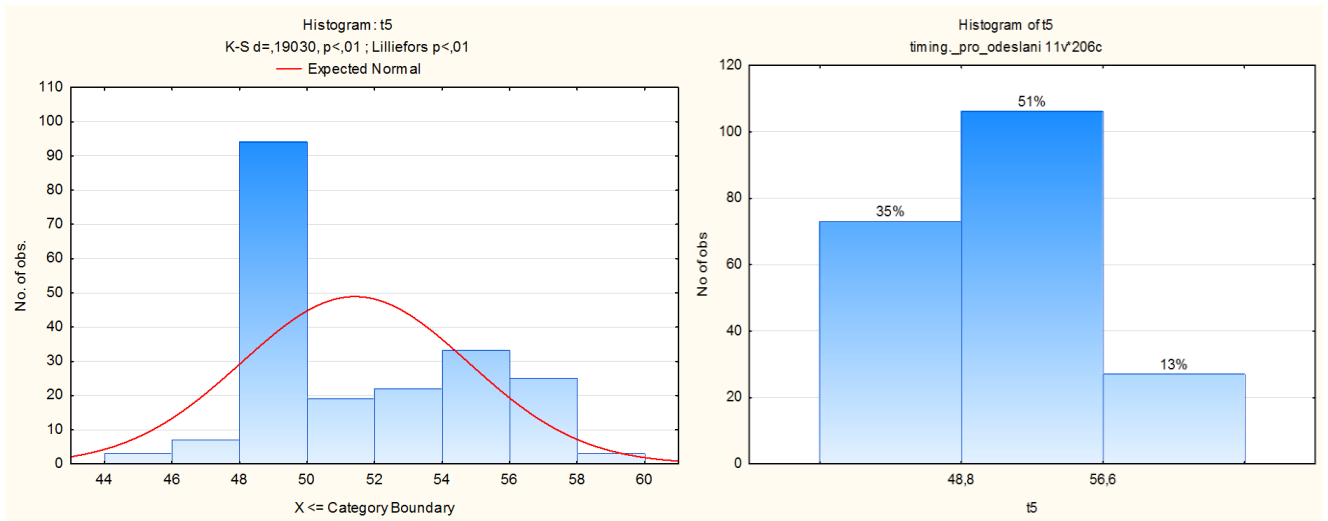
Graf 1: Analýza celého souboru v čase t2 a procentuální zastoupení embryí v čase t2 v optimálním rozmezí.



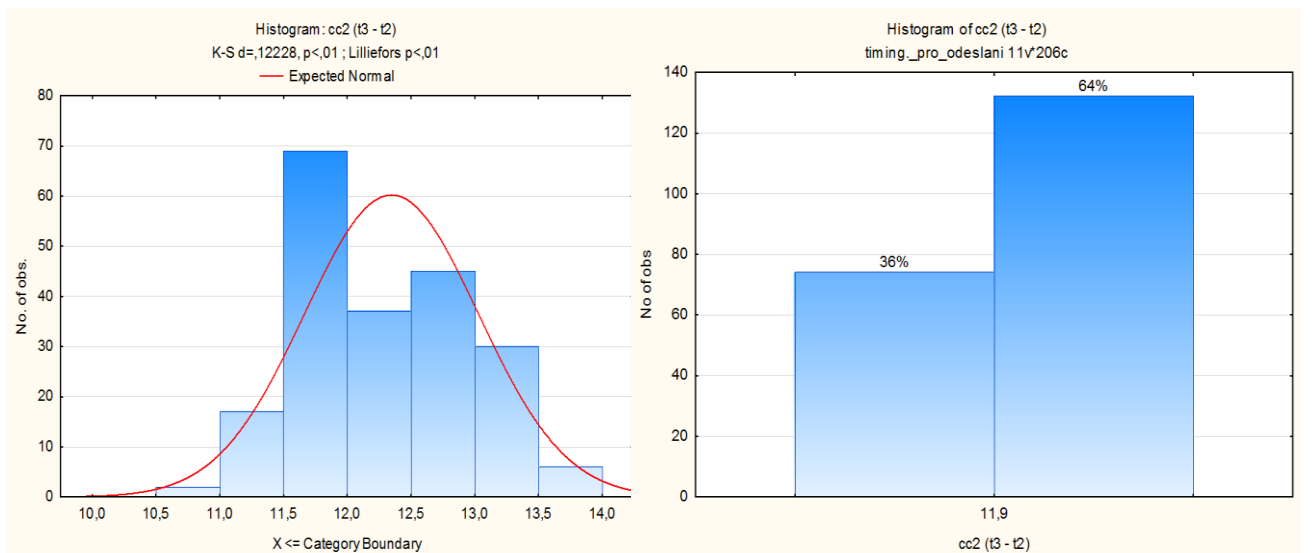
Graf 2: Analýza celého souboru v čase t3 a procentuální zastoupení embryí v čase t3 v optimálním rozmezí



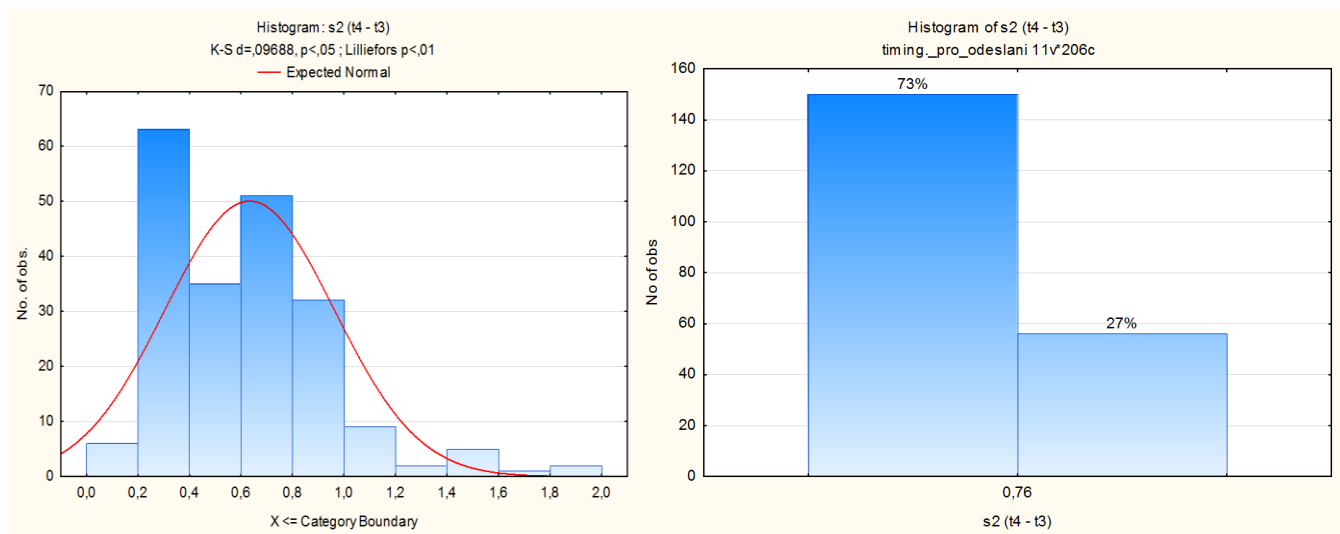
Graf 3: Analýza celého souboru v čase t5 a procentuální zastoupení embryí v čase t5 v optimálním rozmezí



Graf 4: Analýza celého souboru v čase cc2 a procentuální zastoupení embryí v čase cc2 v optimálním rozmezí



Graf 5: Analýza celého souboru v čase s2 a procentuální zastoupení embryí v čase s2 v optimálním rozmezí



5.2.1 Stádium blastocysty (B), stádium blastocysty s dobrou morfológickou kvalitou (GMB) - reálné naměřené hodnoty

Byla provedena analýza časů dělení embryí v závislosti na vývoji embryí do stádia blastocysty a následně byla provedena vyšší selekce na skupinu hodnocenou jako blastocysty dobré kvality (GMB - pouze blastocysty s dobře definovaným *inner cell mass* a *trophectoderm*), tzn. embrya, která jsou nejvhodnější k transferu po pětidenní kultivaci v podmínkách *in vitro*. U embryí, která se vyvinula do stádia blastocysty (B) a následně do GMB byl statistickým hodnocením u časových proměnných t2, t3, t5 a cc2 stanoven rozdíl v čase dělení embryí. Embrya, která se dělila rychleji, měla signifikantně vyšší počet blastocyst a následně i GMB. U skupiny B byl ze všech sledovaných časových proměnných potvrzen statisticky významný rozdíl v časových bodech t2, t3, t5 a cc2 ve prospěch rychleji se dělících embryí, ve skupině GMB byl ze všech sledovaných časových proměnných stanoven statisticky významný rozdíl ve všech časových bodech (t2, t3, t5, cc2 a s2). Po statistickém zhodnocení naměřených reálných časů dělení embryí lze usuzovat, že embrya s rychlejším dělením měla větší šanci dospět do stádia GMB (viz tab. 3).

Tab. 3: *Statistické zhodnocení reálných časů dělení embryí do stádia B a GMB*

BSC	B (n = 83)	NoB (n = 123)	P- value	GMB (n = 46) ¹	NoB (n = 123)	P- value
t2	26,25	27,04	$p \leq 0.05$	26,14	27,04	$p \leq 0.05$
t3	38,09	39,1	$p \leq 0.05$	38,06	39,1	$p \leq 0.05$
t5	49,8	52,51	$p \leq 0.05$	49,84	52,51	$p \leq 0.05$
cc2	11,94	12,63	$p \leq 0.05$	12,01	12,63	$p \leq 0.05$
s2	0,58	0,67	NS	0,36	0,67	$p \leq 0.05$

Uvedené hodnoty - medián času v hodinách

NS - není statisticky signifikantní rozdíl

¹ pouze blastocysty s dobře definovaným inner cell mass a trophectoderm

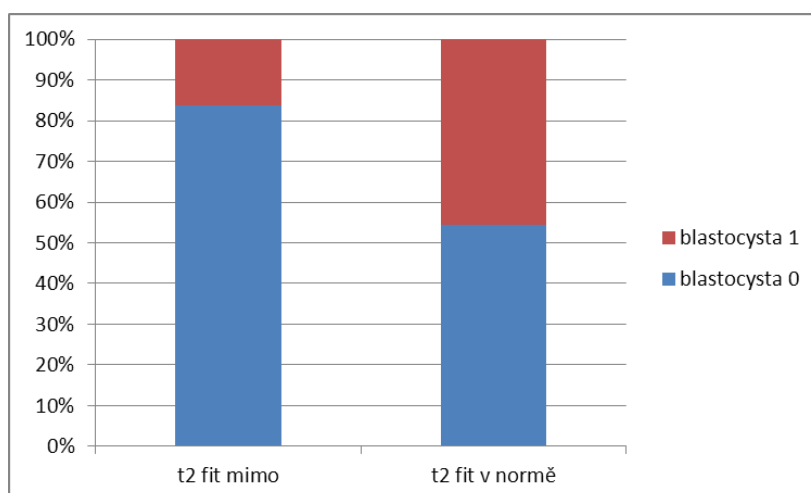
BSC (buněčné stádium cyklu), B (Blastocysta), NoB (nepřítomnost stádia Blastocysty), GMB (blastocysta dobré kvality)

Reálné časové hodnoty, které vedly k vývoji embryí do stádia B a GMB, byly následně porovnány a statisticky vyhodnoceny s jednotlivými optimálními časovými proměnnými navrženými Metseguerem et al. (2011).

5.2.2 Stádium blastocysty (B) – srovnání reálných časů s navrženým optimálním rozmezím

Srovnání optimálních časových proměnných s naměřenými reálnými hodnotami pro blastocysty (B) bylo statisticky vyhodnoceno pro jednotlivé časové body t2, t3, t5, cc2 a s2 (viz grafy 6 až 10). V časových bodech t5 (viz tab. 6) a s2 (viz tab. 8) nebyla nalezena statisticky významná shoda s navrženými optimálními proměnnými. Ze sledovaného souboru lze tedy potvrdit shodu ve stanoveném optimálním časovém rozmezí navržené Meseguerem et al. (2011) v časových bodech t2, t3 a cc2 (viz tab. 4, 5 a 7) jako predikci k vývoji embrya do stádia blastocysty.

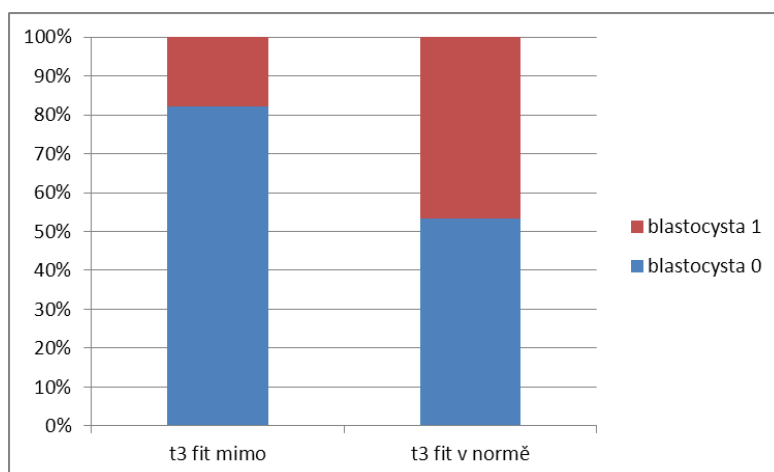
Graf 6: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2



Tab. 4: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2

Statistic	Statistics: t2 fit(2) x blastocysta(2) (timing._pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	9,680357	df=1	p=,00186
Fisher exact, one-tailed			p=,00060
two-tailed			p=,00081
McNemar Chi-square (A/D)	18,75000	df=1	p=,00001
(B/C)	73,72440	df=1	p=,00000

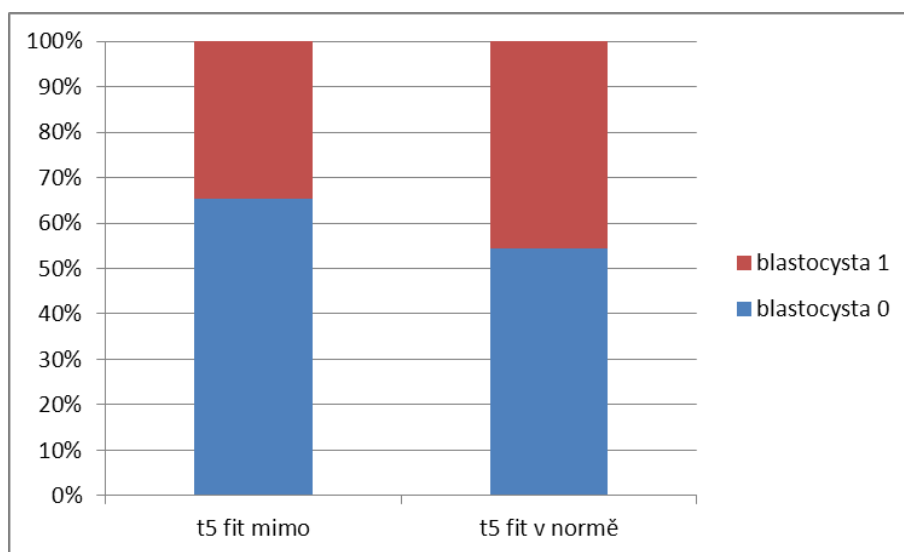
Graf 7: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3



Tab. 5: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3

Statistic	Statistics: blastocysta(2) x t3 fit(2) (timing._pro_odeslan		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	10,96295	df=1	p=,00093
Fisher exact, one-tailed			p=,00036
two-tailed			p=,00051
McNemar Chi-square (A/D)	12,22321	df=1	p=,00047
(B/C)	63,07447	df=1	p=,00000

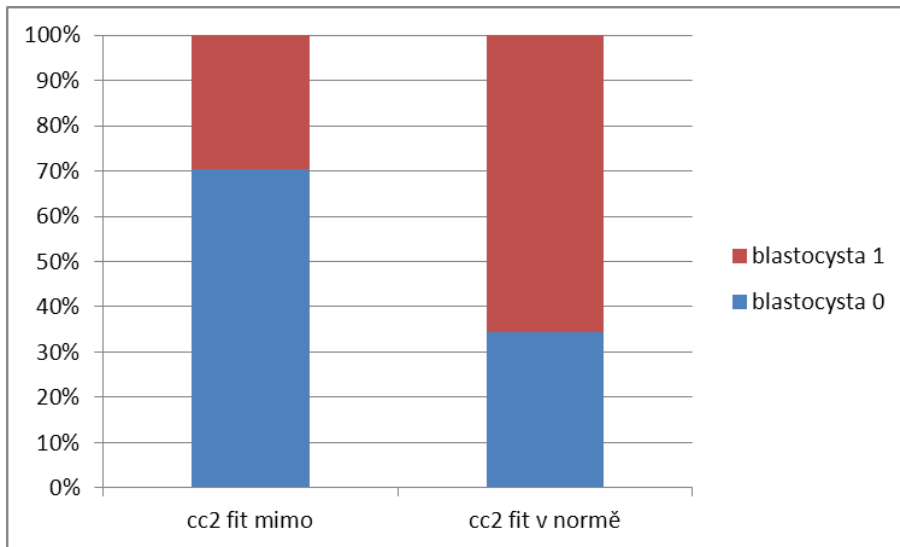
Graf 8: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5



Tab. 6: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5

Statistic	Statistics: blastocysta(2) x t5 fit(2) (timing._pro_odeslan		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	2,178416	df=1	p=,13996
Fisher exact, one-tailed			p=,06984
two-tailed			p=,11924
McNemar Chi-square (A/D)	2,535088	df=1	p=,11134
(B/C)	4,793478	df=1	p=,02857

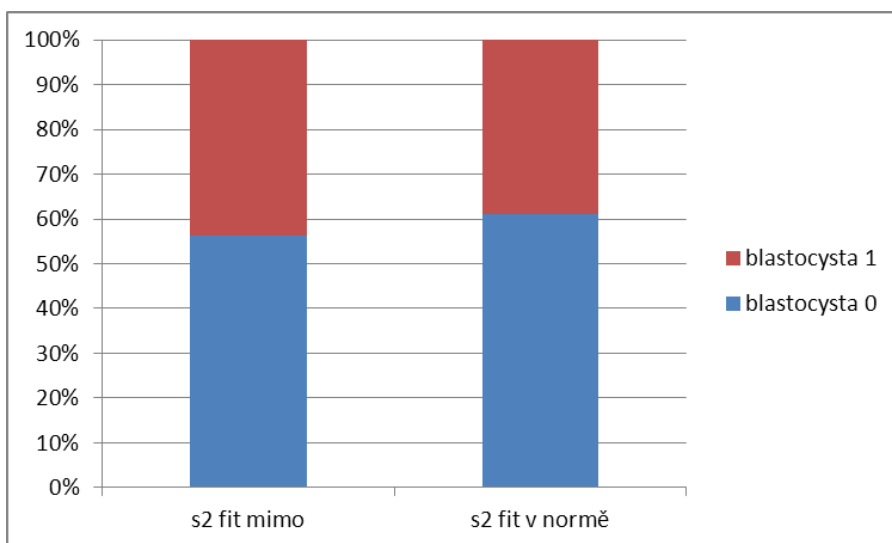
Graf 9: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2



Tab. 7: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2

Statistics: blastocysta(2) x cc2 fit(2) (timing._pro_odeslan			
Statistic	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	21,5572	df=1	p=,0000
Fisher exact, one-tailed			p=,0000
two-tailed			p=,0000
McNemar Chi-square (A/D)	26,2042	df=1	p=,0000
(B/C)	6,89062	df=1	p=,0086

Graf 10: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2



Tab. 8: *Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2*

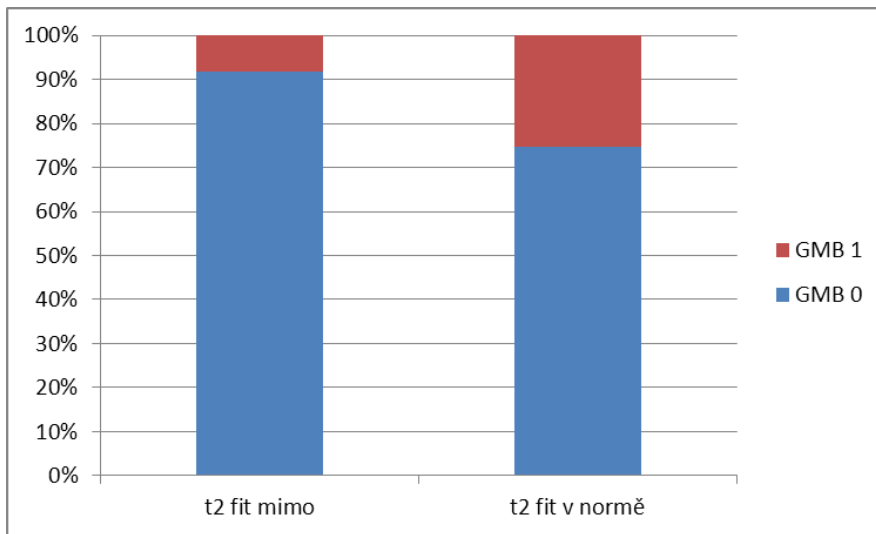
Statistic	Statistics: blastocysta(2) x s2 fit(2) (timing._pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	,2372450	df=1	p=,62620
Fisher exact, one-tailed			p=,31197
two-tailed			p=,52939
McNemar Chi-square (A/D)	6,944444	df=1	p=,00841
(B/C)	36,42241	df=1	p=,00000

5.2.3 Stádium blastocysty s dobrou kvalitou (GMB) – srovnání časů s navrženým optimálním rozmezím

Následně byl stejným způsobem zhodnocen soubor GMB. Hodnoty, které vedly ke stanovení počtu embryí, které se vyvinuly do stádia GMB, byly následně porovnány a statisticky vyhodnoceny s jednotlivými optimálními časovými proměnnými stanovenými Metseguerem et al. (2011).

Srovnání proměnných s naměřenými reálnými hodnotami pro blastocysty s dobrou kvalitou (GMB), bylo statisticky vyhodnoceno pro jednotlivé časové body t2, t3, t5, cc2 a s2 (viz grafy 11 až 15). V časových bodech t5 a s2, nebyla nalezena statisticky významná shoda s navrženými optimálními proměnnými (viz tab. 11 a 13). Ze sledovaného souboru lze potvrdit shodu ve stanoveném optimálním časovém rozmezí navržené Meseguerem et al. (2011) pouze v časových bodech t2 a t3 (viz tab. 9 a 10) jako predikci k vývoji embrya do stádia blastocysty s dobrou kvalitou. Ve sledovaném souboru lze tedy potvrdit shodu ve stanoveném optimálním časovém rozmezí navržené Meseguerem et al. (2011) v časových bodech t2, t3 jako predikci k vývoji embrya do stádia blastocysty.

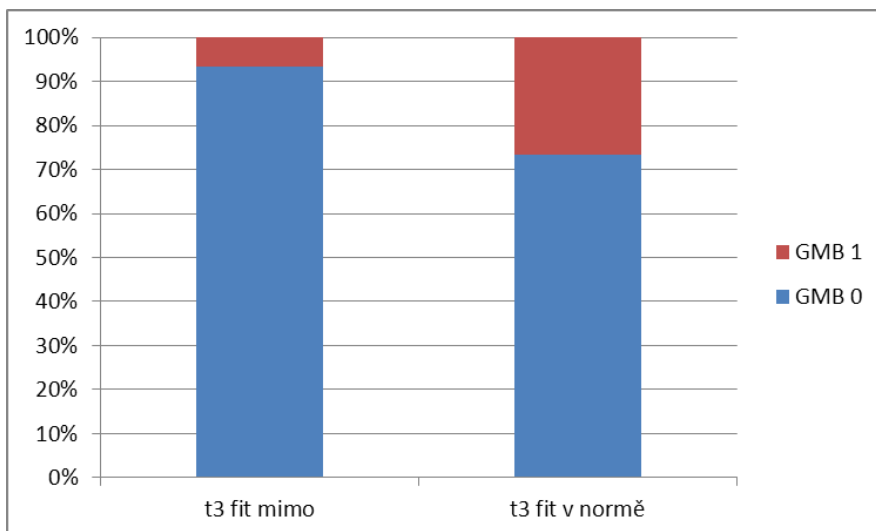
Graf 11: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2



Tab. 9: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2

Statistic	Statistics: GMB(2) x t2 fit(2) (timing._pro_odeslan)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	4,307636	df=1	p=,03794
Fisher exact, one-tailed			p=,01379
two-tailed			p=,02754
McNemar Chi-square (A/D)	,8311688	df=1	p=,36193
(B/C)	115,3798	df=1	p=0,0000

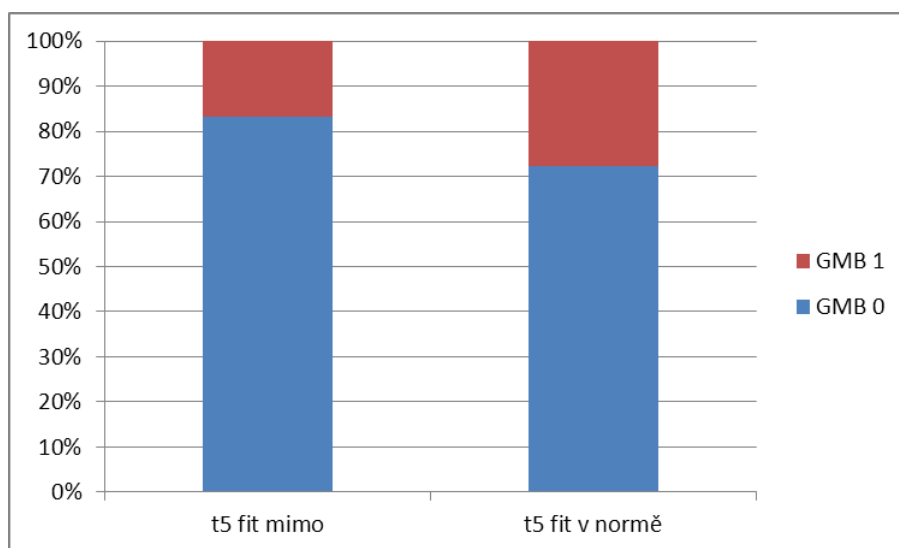
Graf 12: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3



Tab. 10: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3

Statistics: GMB(2) x t3 fit(2) (timing._pro_odeslan)			
Statistic	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	7,030317	df=1	p=,00801
Fisher exact, one-tailed			p=,00213
two-tailed			p=,00399
McNemar Chi-square (A/D)	0,000000	df=1	p=1,00000
(B/C)	107,4050	df=1	p=0,00000

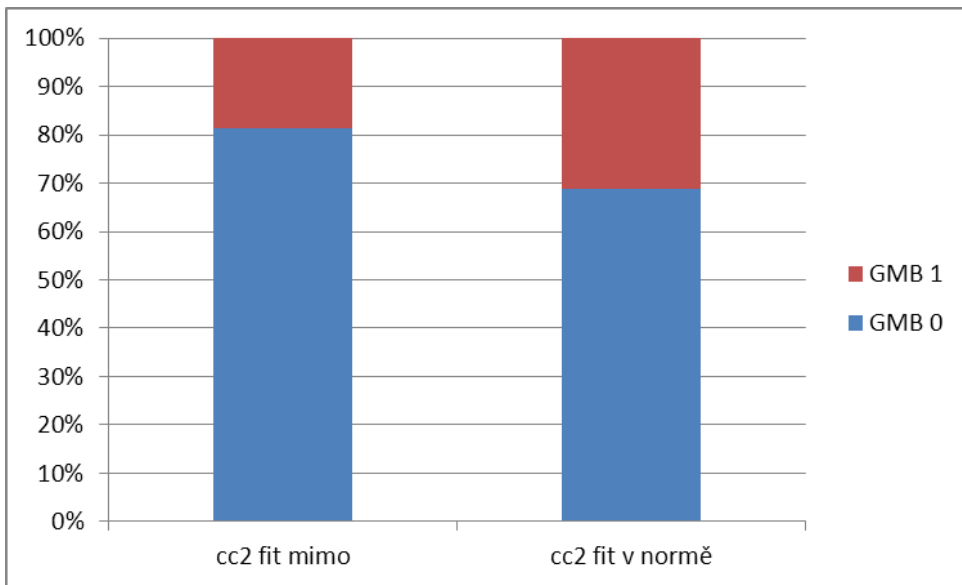
Graf 13: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5



Tab. 11: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5

Statistics: GMB(2) x t5 fit(2) (timing._pro_odeslan)			
Statistic	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	2,860093	df=1	p=,09080
Fisher exact, one-tailed			p=,04496
two-tailed			p=,06798
McNemar Chi-square (A/D)	25,80531	df=1	p=,00000
(B/C)	36,17204	df=1	p=,00000

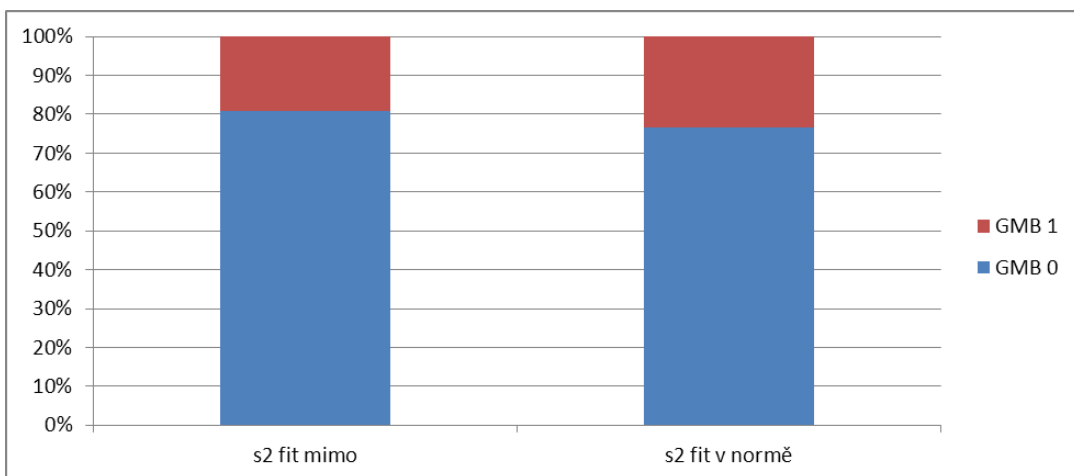
Graf 14: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2



Tab. 12: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2

Statistic	Statistics: GMB(2) x cc2 fit(2) (timing._pro_odeslaní)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	3,19612	df=1	p=,07381
Fisher exact, one-tailed			p=,03883
two-tailed			p=,06606
McNemar Chi-square (A/D)	70,1021	df=1	p=,00000
(B/C)	2,84058	df=1	p=,09191

Graf 15: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2



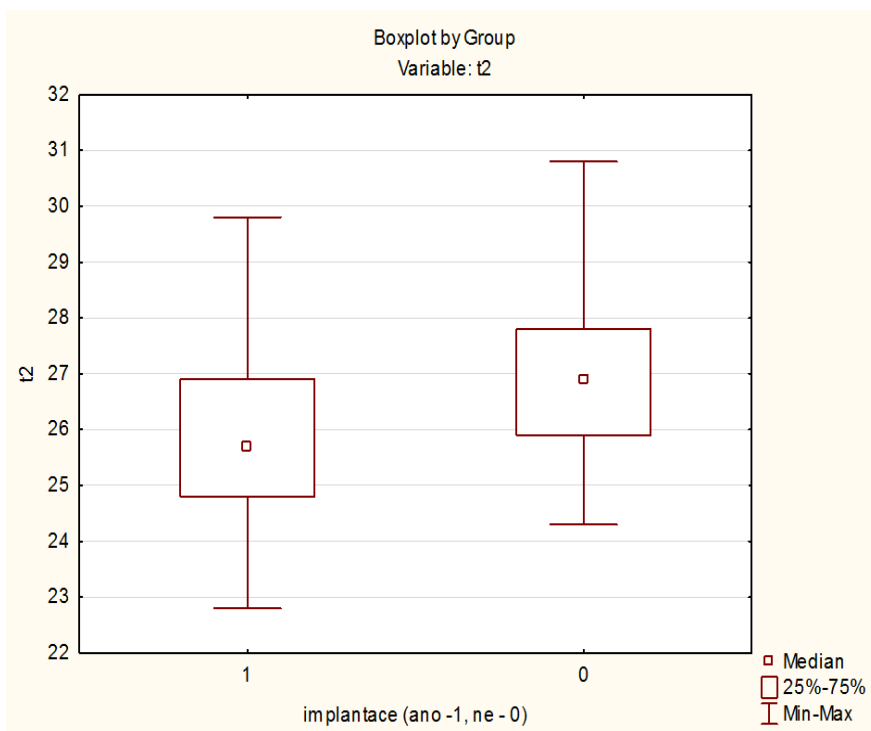
Tab. 13: *Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2*

Statistic	Statistics: GMB(2) x s2 fit(2) (timing._pro_odeslani		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	,2109450	df=1	p=,64603
Fisher exact, one-tailed			p=,32772
two-tailed			p=,57887
McNemar Chi-square (A/D)	1,234567	df=1	p=,26652
(B/C)	83,23200	df=1	p=0,00000

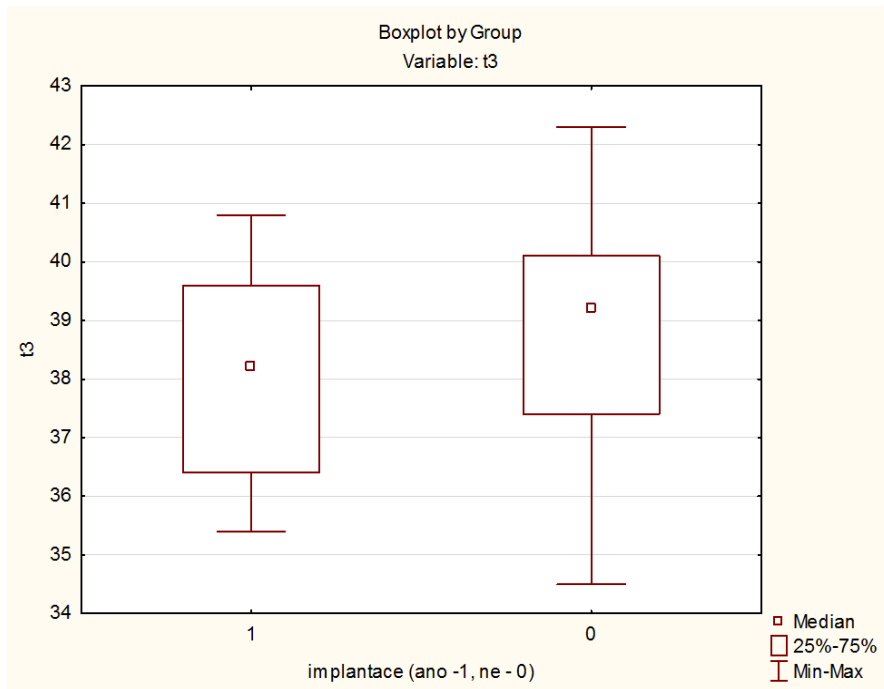
5.2.4 Implantace embryí

Po transferu embryí do dělohy ženy příjemkyně, a následné implantaci embryí byly opět statisticky vyhodnoceny jednotlivé reálné časové proměnné (viz grafy 16 až 20). Jako vhodný indikátor k úspěšné implantaci embryí se jeví časy označené t2, t3 a cc2, kde signifikantně rychlejší čas dělení embryí vedl k vyšší implantaci (viz tab. 14). Po srovnání s navrženými optimálními časovými hodnotami lze potvrdit shodu v časových bodech t3 a t5 (viz grafy 17 a 18) jako možnou predikci k úspěšné implantaci embryí. Hodnota t5 se však ve statistickém hodnocení reálných časových hodnot ve sledovaném souboru jeví jako statisticky nevýznamná (viz tab. 14).

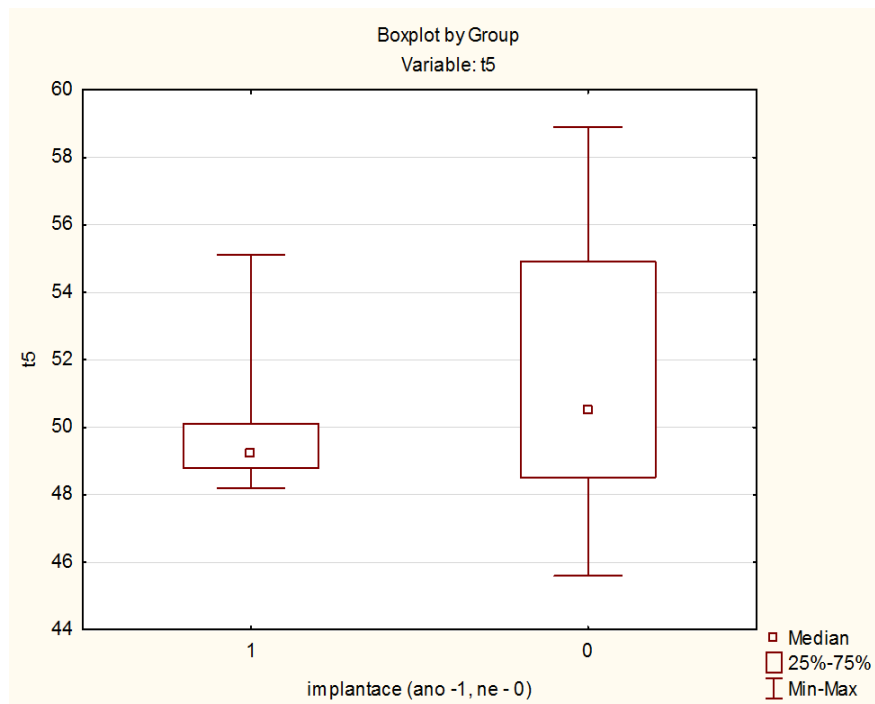
Graf 16: *Implantace embryí v reálném čase t2*



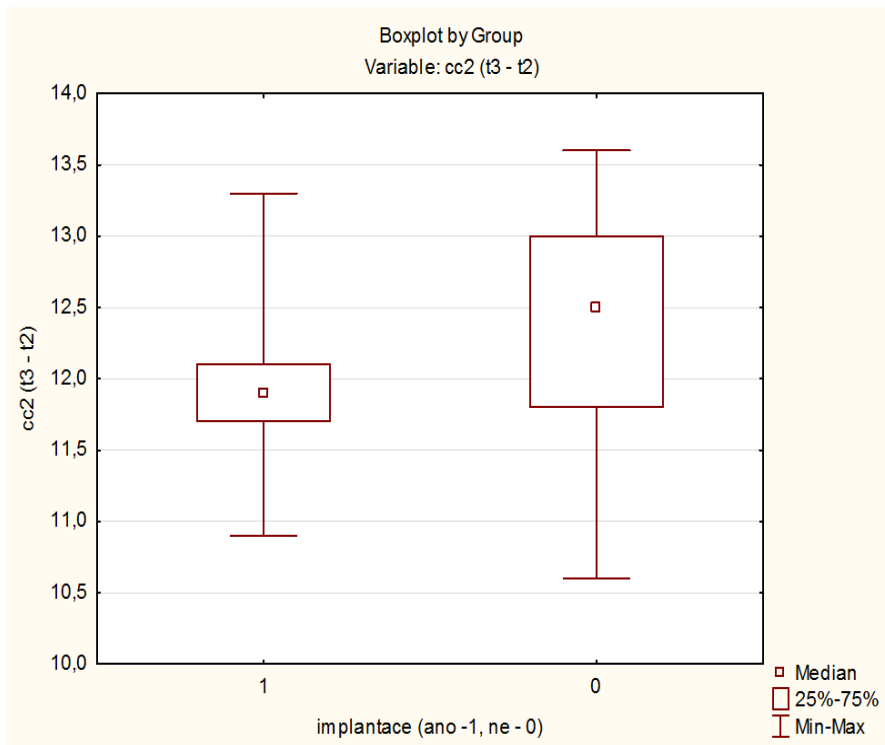
Graf 17: *Implantace embryí v reálném čase t3*



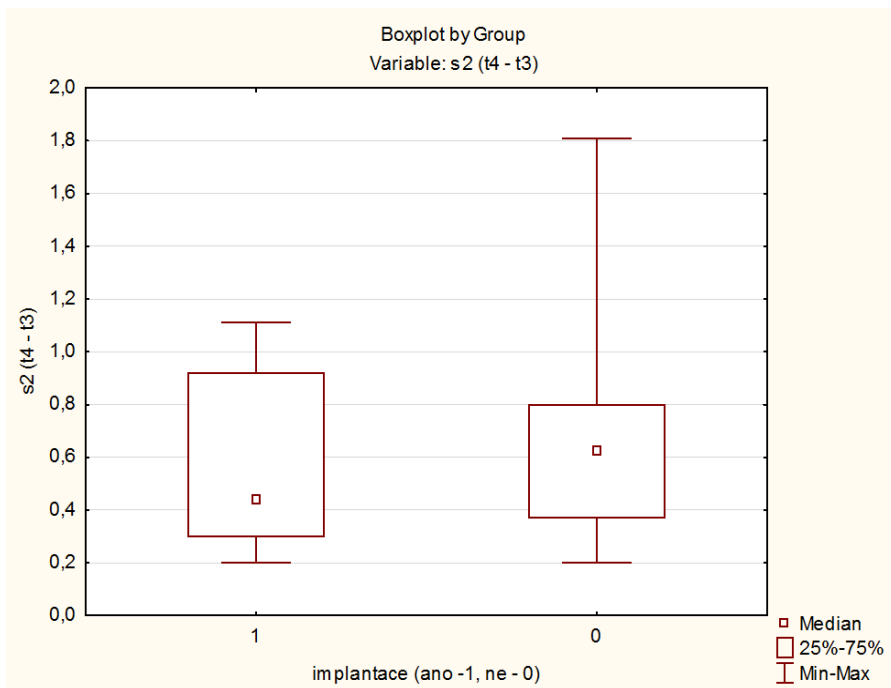
Graf 18: *Implantace embryí v reálném čase t5*



Graf 19: *Implantace embryí v reálném čase cc2*



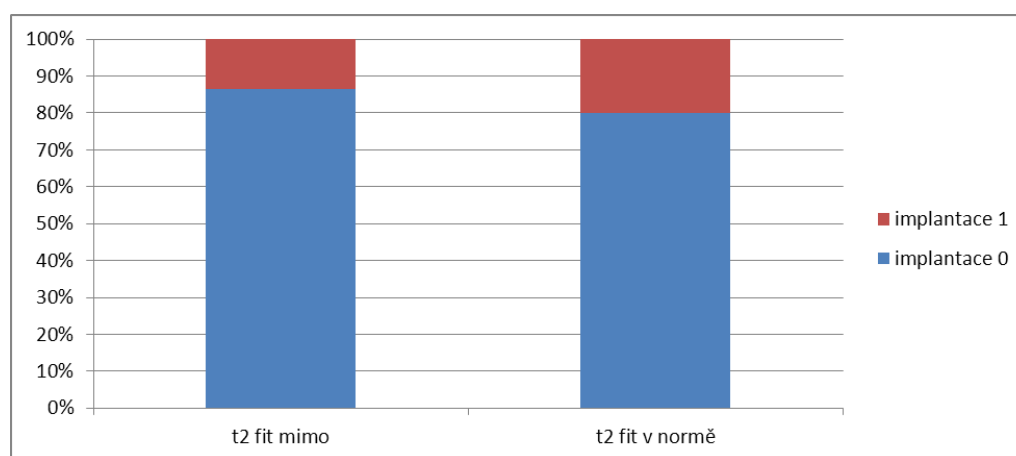
Graf 20: *Implantace embryí v reálném čase s2*



Tabulka 14: *Statistické zhodnocení implantace v reálných časech*

Mann-Whitney U Test (w/ continuity correction) (timing_pro_odeslani)									
By variable implantace (ano -1, ne - 0)									
Marked tests are significant at p <,05000									
variable	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N Group 1	Valid N Group 2
t2	2914,500	18406,50	2134,500	-3,34591	0,000820	-3,34758	0,000815	39	167
t3	3104,500	18216,50	2324,500	-2,77906	0,005452	-2,77987	0,005438	39	167
t5	3440,000	17881,00	2660,000	-1,77812	0,075385	-1,77886	0,075264	39	167
cc2 (t3 - t2)	2888,000	18433,00	2108,000	-3,42497	0,000615	-3,42947	0,000605	39	167
s2 (t4 - t3)	3598,000	17723,00	2818,000	-1,30674	0,191302	-1,31071	0,189956	39	167

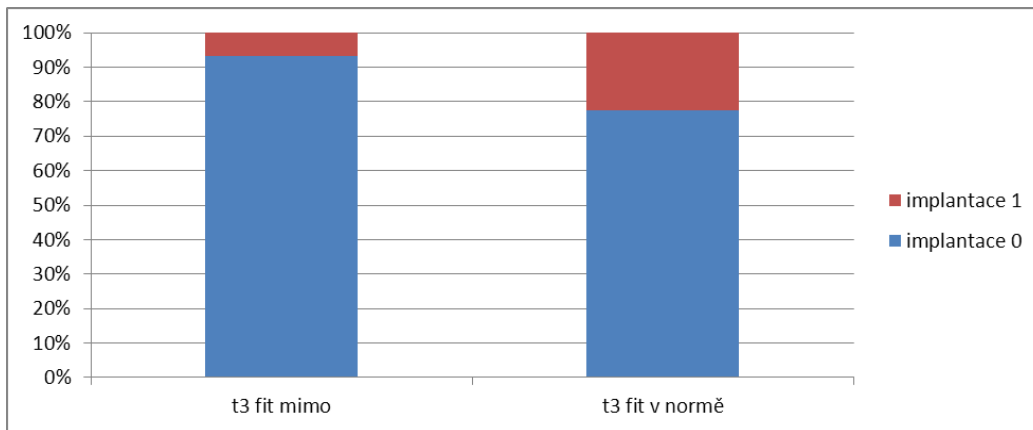
Graf 21: *Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2*



Tab. 15: *Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2*

Statistic	Statistics: implantace (ano -1, ne - 0)(2) x t2 fit(2) (timing_pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	,4860950	df=1	p=,48567
Fisher exact, one-tailed			p=,24838
two-tailed			p=,48773
McNemar Chi-square (A/D)	,0151515	df=1	p=,90203
(B/C)	118,8643	df=1	p=0,0000

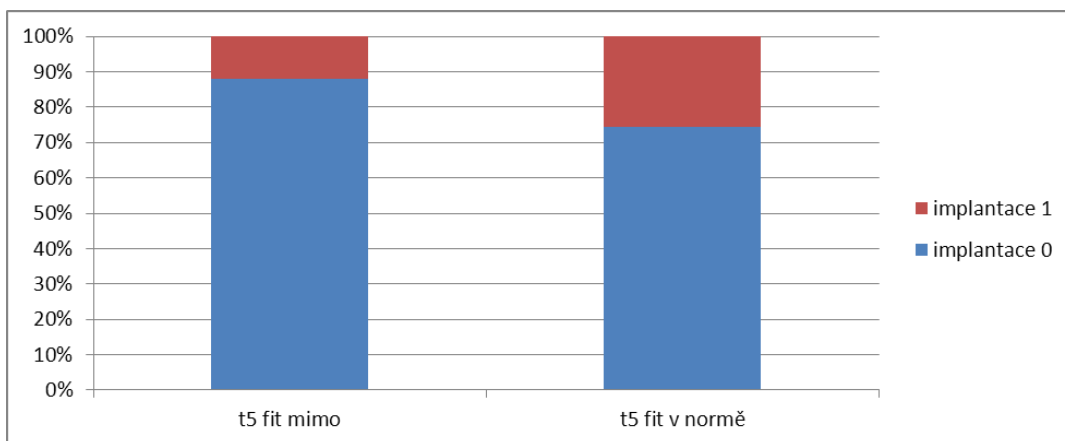
Graf 22: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3



Tab. 16: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3

Statistic	Statistics: implantace (ano -1, ne - 0)(2) x t3 fit(2) (timing._pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	4,667548	df=1	p=,03074
Fisher exact, one-tailed			p=,01072
two-tailed			p=,01739
McNemar Chi-square (A/D)	,3205128	df=1	p=,57130
(B/C)	114,3828	df=1	p=0,0000

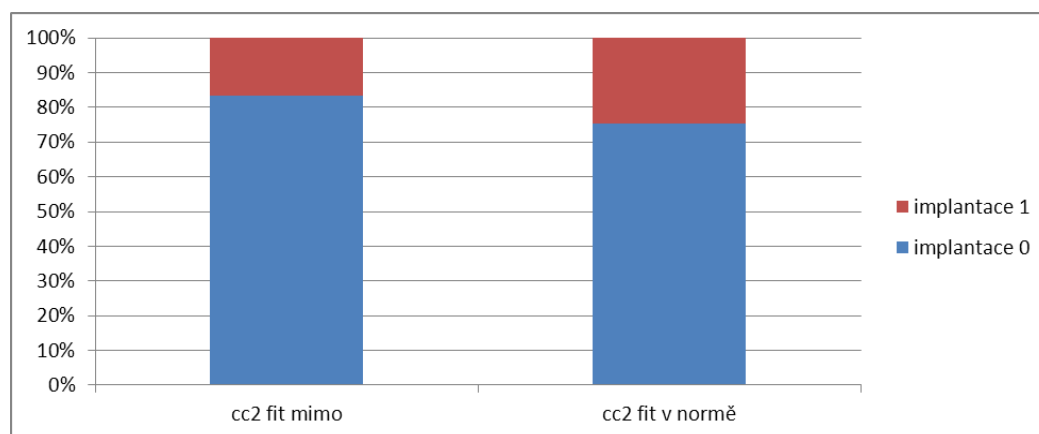
Graf 23: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5



Tab. 17: *Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5*

Statistic	Statistics: implantace (ano -1, ne - 0)(2) x t5 fit(2) (timing._pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	5,548866	df=1	p=,01849
Fisher exact, one-tailed			p=,00878
two-tailed			p=,01288
McNemar Chi-square (A/D)	32,07759	df=1	p=,00000
(B/C)	46,94444	df=1	p=,00000

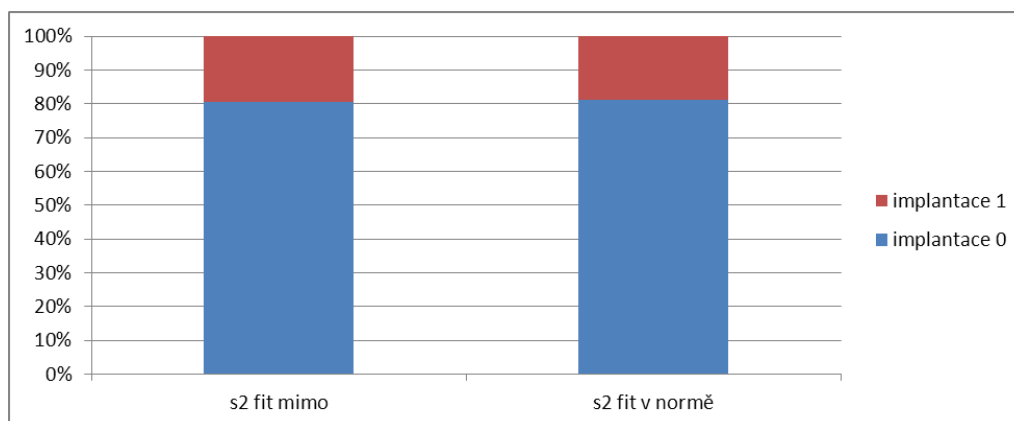
Graf 24: *Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2*



Tab. 18: *Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2*

Statistic	Statistics: implantace (ano -1, ne - 0)(2) x cc2 fit(2) (timing._pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	1,321890	df=1	p=,25025
Fisher exact, one-tailed			p=,12596
two-tailed			p=,17977
McNemar Chi-square (A/D)	81,06618	df=1	p=0,0000
(B/C)	6,300000	df=1	p=,01207

Graf 25: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2



Tab. 19: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2

Statistic	Statistics: implantace (ano -1, ne - 0)(2) x s2 fit(2) (timing_pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	,0134069	df=1	p=,90782
Fisher exact, one-tailed			p=,53867
two-tailed			p=1,0000
McNemar Chi-square (A/D)	3,905406	df=1	p=,04813
(B/C)	90,00758	df=1	p=0,0000

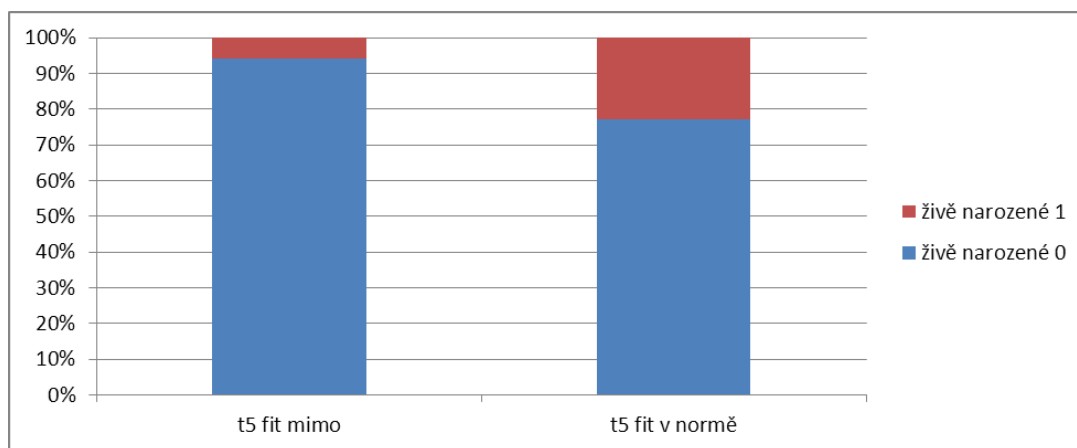
5.2.5 Porod živého dítěte (ŽDN)

Embrya, která se úspěšně implantovala, byla zhodnocena po uplynutí doby gravidity v závislosti na porodu živého dítěte. Po statistickém zhodnocení reálných časových proměnných se jako statisticky významný jeví časový bod cc2 (viz tab. 20). V následném srovnání s navrženými optimálními časovými proměnnými je zde statisticky významná shoda jen v časovém bodě t5 (viz graf 26 a tab. 21), která se však ve statistickém hodnocení reálných časových hodnot ve sledovaném souboru jeví jako statisticky nevýznamná.

Tab. 20: Statistické zhodnocení porodu živého dítěte v reálných časech

Mann-Whitney U Test (w/ continuity correction) (timing_pro_odeslani)									
By variable ŽND (ano - 1, ne - 0)									
Marked tests are significant at p <,05000									
variable	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N Group 1	Valid N Group 2
t2	2607,500	18713,50	2142,500	-1,64682	0,099597	-1,64764	0,099428	30	176
t3	2638,500	18682,50	2173,500	-1,54410	0,122566	-1,54455	0,122457	30	176
t5	2872,500	18448,50	2407,500	-0,76873	0,442051	-0,76905	0,441862	30	176
cc2 (t3 - t2)	2343,000	18978,00	1878,000	-2,52324	0,011628	-2,52656	0,011519	30	176
s2 (t4 - t3)	2677,500	18643,50	2212,500	-1,41487	0,157108	-1,41917	0,155850	30	176

Graf 26: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5



Tab. 21: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5

Statistic	Statistics: ŽND (ano - 1, ne - 0)(2) x t5 fit(2) (timing_pro_odeslani)		
	Chi-square	df	p
Yates Chi-square	10,51986	df=1	p=,00118
Fisher exact, one-tailed			p=,00044
two-tailed			p=,00063
McNemar Chi-square (A/D)	41,17647	df=1	p=,00000
(B/C)	62,94253	df=1	p=,00000

5.2.6 Závěrečné zhodnocení celého souboru reálných časů a srovnání s navrženými optimálními rozmezími

Ve sledovaném souboru se jako statisticky významný indikátor k predikci výběru „top“ embrya jeví časová proměnná cc2 - označení času, kdy embryo setrvalo ve 2-buněčném stádiu k vydělení do 3-buněčného stádia, (viz tab. 22). Za optimální čas cc2 stanovený na základě měření reálných časových proměnných, v závislosti na vývoji

embrya do stádia GMB (nejvhodnější stádium k transferu po pětidenní kultivaci *in vitro*), implantaci a porod živého dítěte byl stanoven čas dělení v rozmezí: 11,6 až 12,01 hodin od oplození vajíčka.

Tab. 22: Stanovení optimální časové proměnné

	RH / statistická významnost	OH vs. RH/ statistická shoda
B	t2, t3, t5, cc2	t2, t3, cc2
GMB	t2,t3, t5, cc2, s2	t2, t3
Implantace	t2, t3, cc2	t3, t5
Porod	cc2	t5

RH - reálné hodnoty

OH vs. RH - optimální hodnoty versus reálné hodnoty

B – Blastocysta

GMB – Blastocysta dobré kvality

5.2.7 Hodnocení embryí na základě hierarchické klasifikace

Embrya ve stádiu blastocysty byla rozdělena do čtyř kategorií od třídy A po třídu D. Hierarchická klasifikace byla kromě morfologické kvality embryí stanovena i na základě časových proměnných dle Meseguera et al. (2011), který navrhl optimální časové rozmezí. Výběr byl primárně hodnocen podle časové proměnné t5 a sekundární proměnné s2. V případě, že hodnota t5 byla v optimálním časovém rozsahu (48,8 až 56,6 h), embryo bylo hodnoceno jako A nebo B. V případě, že hodnota t5 klesla mimo optimální rozsah, bylo embryo vyhodnoceno jako C nebo D. Pokud s2 byla v optimálním rozsahu ($\leq 0,76$ h) bylo embryo hodnoceno jako A, jestliže zároveň t5 bylo v optimálním rozsahu a C pokud t5 bylo mimo optimální rozsah. Stejně tak pokud $s2 > 0,76$ h, embryo bylo hodnoceno jako B jestliže bylo t5 v optimálním rozsahu a D jestliže t5 bylo mimo optimální rozsah. Z této klasifikace se dá očekávat, že embrya s klasifikací třídy A budou mít nejvyšší míru implantace, nejnižší třída D a středním hodnotám přísluší třída B a C (viz obr. 19, str. 78). Výsledné rozdělení embryí, bylo stanoveno, kromě času i na základě morfologické kvality.

Do souboru byly zařazeny jen embrya, která se dělila do stádia blastocysty a následně byla transferována, aby mohla být porovnána hierarchická klasifikace embryí s živě narozeným dítětem (ŽDN). Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 23. Z celkového počtu blastocyst bylo 57,5 % kvality A, 53,3 % kvality B, 31,6 % kvality C a 22,2 % kvality

D. U skupiny A bylo 78,3 % embryí GMB, které vedly k porodu živého dítěte. U embryí BMB to bylo 13 %. U skupiny B bylo 62,5 % embryí GMB, které dospěly k porodu živého dítěte, u skupiny BMB to bylo 25 %. Skupina C, zde bylo 33,3 % embryí GMB, které vedly k porodu živého dítěte a žádné embryo BMB. U skupiny D žádná z transferovaných blastocyst nevedla k porodu živého dítěte. Na základě zjištění, které vedlo Meseguera et al. (2011) k nastavení hodnocení hierarchické klasifikace embryí, lze jednoznačně potvrdit stejný závěr, a to, že výsledná embrya s klasifikací třídy A měla nejvyšší míru implantace, resp. porodu živého dítěte, třída B byla v této práci hodnocena velmi dobře jako skupina A. Naopak skupina C již vykazovala nízké hodnoty a ve skupině D nebyl zaznamenán žádný porod živého dítěte.

Tab. 23: Hierarchická klasifikace embryí v závislosti na porodu živého dítěte

	TIB % (n = 39)	TŽDN z GMB % (n = 25)	TŽND z BMB % (n = 5)	TŽND % (n = 30)
A	57,5 (23)	78,3 (18)	13,0 (3)	91,3 % (21)
B	53,3 (8)	62,5 (5)	25,0 (2)	87,5 % (7)
C	31,6 (6)	33,3 (2)	0 (0)	33,3 % (2)
D	22,2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 % (0)

TIB - celkový počet blastocyst

TŽDN z GMB - celkový počet živě narozených dětí z blastocyst dobré kvality

TŽDN z BMB - celkový počet živě narozených dětí z blastocyst špatné kvality

TŽND - celkový počet živě narozených dětí

6 DISKUZE

Již od prvopočátku oplodnění lidského vajíčka *in vitro* byla snaha o pozorování vývoje embrya v laboratorních podmínkách. Pochopit zákonitosti vývoje a stanovit parametry pro správný výběr embrya pro následný přenos do dělohy ženy.

Počáteční pozorování oplodnění lidského vajíčka a raný vývoj embrya prostřednictvím časosběrné mikroskopie byly uvedeny McKiernanem et al. (1994), Paynem et al. (1997) a o několik let později Lemmenem et al. (2008) a Hestersem et al. (2008). Pro výběr nejvhodnějšího embrya bylo stanoveno i morfologické skóre (Fisch et al. 2001; Langley et al. 2001).

Ve své práci jsem se zaměřila na metodu kontinuálního sledování vývoje embryí v podmínkách *in vitro* za pomoci time-laps mikroskopie. Tato poměrně nová metoda je již rutinně využívána v předních IVF laboratořích po celém světě. Umožňuje s poměrně vysokou spolehlivostí vybrat vhodná embrya k transferu a nabízí novou řadu příležitostí ke studiu buněčného dělení raného embrya. Tuto teorii potvrzují i zahraniční studie. Nakahara et al. (2010) i Basile a Meseguer (2012) uvádí, že použití metody time-lapse mikroskopie pro studium vývoje embryí se v posledních letech, jeví jako velmi dobrý způsob pro výběr vhodného embrya k transferu v klinické embryologii.

V prezentované disertační práci byly v souvislosti s těmito poznatky a využitím time-lapse mikroskopie porovnány významné časové proměnné ve vývoji embryí a srovnány s výsledky současných vědeckých prací, zabývajících se kontinuálním monitoringem embrya v závislosti na čase dělení.

První časovou proměnnou bylo hodnocení časného embryonálního dělení, které je definováno jako časné dělení buněk embrya do 2-buněčného stádia v časovém rozpětí 25 - 27 hodin po ICSI. Po zhodnocení časového potenciálu vývoje embryí se nabízí závěr, že časné dělení embryí v této fázi jednoznačně poukazuje na dobrou prognózu vývoje embrya do stádia kvalitní blastocysty, ale není spolehlivým ukazatelem následného těhotenství. Dělení embrya do 2-buněčného stádia a jeho vliv na těhotenství byl poprvé zveřejněn týmem Edwardse (Edwards et al., 1984). Mnoho studií následně použilo tento koncept jako základ svých prací (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998, 2001; Bos-Mikich et al., 2001; Lundin et al., 2001; Salumets et al., 2001; Fenwick et al., 2002; Tsai et al., 2002; Ciray et al., 2006). Ze závěrů těchto prací vyplývá, že přenos embryí s raným dělením přináší lepší výsledky v implantaci i v počtu těhotenství ve

srovnání s transfery embryí, která měla pomalejší vývoj. S tímto závěrem po zhodnocení své práce nemohu jednoznačně souhlasit, protože první časné dělení embrya se neprokázalo jako spolehlivý ukazatel dobré implantace a následného těhotenství. Jako možný rozpor ve výsledcích těchto studií je skutečnost, že byla většinou transferována embrya po dvou nebo tří denní kultivaci. V současné době jsou již embrya ve většině laboratoří kultivována *in vitro* pět až šest dní do stádia blastocysty. Díky modernějšímu přístrojovému vybavení laboratoře, které umožňuje kontinuální monitoring embryí, je možné jak detailnější pozorování vývoje embryí, tak i možnost sledování dalších časových proměnných, které mají daleko větší prediktivní hodnotu. Celkově se díky prodloužené kultivaci embryí do stádia blastocysty výrazně zvýšilo i procento úspěšnosti léčby.

Mnou zjištěná data poukazují na skutečnost, že embrya, která se v počátcích vývoje dělí rychleji, mají výrazně vyšší šanci dalšího rozvoje do 5. dne kultivace ve srovnání s embryi s pomalejším vývojem. V práci bylo prokázáno, že životaschopnost embryí a potenciál růstu do stádia blastocysty, je spojen s přesně časově regulovanými sledy buněčných dějů, které mají počátek v okamžiku oplození. Tento závěr byl prezentován i v pracích Shoukira et al. (1997), Sakkase et al. (1998, 2001), Bos-Mikicha et al. (2001), Salumetse et al. (2001), Fenwicka et al. (2002), Tsaie et al. (2002), Ciraye et al. (2006).

Nicméně, ve výše uvedených studiích bylo v mnoha případech transferováno více než jedno embryo a v mnoha kombinacích, kdy byla transferována embrya s rychlejším i pomalejším dělením společně. Bylo tedy velmi obtížné stanovit, zda časné dělení na počátku vývoje embrya jednoznačně vede k vyšší implantaci.

Ve své práci jsem porovnávala výsledky transferů, kdy byla přenesena výhradně rychle se dělící embrya se skupinou, kde byla transferována embrya s pomalejším vývojem. Ve skupině, kde se transferovala embrya s rychlejším dělením, byl významně vyšší počet těhotenství ve srovnání se skupinou pomaleji se dělících embryí. Rychlejší vývoj embrya do stádia blastocysty výrazně zvýšil počet klinických těhotenství a snížil počet potratů ve srovnání se skupinou pomalejších embryí. Ke stejnému závěru dospěl i Van Montfoort et al. (2004) ve své práci. Embrya s rychlejším vývojovým potenciálem, která dospěla do stádia blastocysty, dosahovala prokazatelně vyšší míry klinických těhotenství a také byl potvrzen nižší počet potratů.

Čas prvního dělení byl rozsáhle zkoumán v mnoha studiích a je již všeobecně vnímán jako dobrý ukazatel vývojového potenciálu embryí, a v případě výběru vhodného em-

brya je vždy upřednostněno to, které se dělí rychleji než to, které má pomalejší vývoj (Lundin et al., 2001; Giorgetti et al., 2007; Terriou et al., 2007). V prezentovaném souboru byl čas rychlého prvního dělení prokázán jako dobrý, resp. spolehlivý ukazatel vývojového potenciálu embrya a se závěrem, že jsou upřednostněna k přenosu ta embrya, která se dělí rychleji, lze z výsledku naměřených časů souhlasit.

Cílem kliniky ReproGenesis, z které je můj prezentovaný soubor, je transferovat jen jedno „top“ embryo, aby bylo zabráněno nežádoucímu vícečetnému těhotenství a s tím souvisejícími těhotenskými komplikacemi s předčasným porodem nedonošených dětí. Tento trend je patrný ve většině Evropských IVF klinik zaměřujících se na snížení počtu vícečetného těhotenství po léčbě pomocí asistované reprodukce, s cílem transferovat jen jedno embryo (Van Royen et al., 1999). Sledovaný soubor disertační práce zahrnuje embrya, která byla kultivována do 5. dne v podmínkách *in vitro*, tak aby bylo možné zhodnotit vývojový potenciál embrya a jeho morfológickou kvalitu s větší přesností. Ke stejnému postupu již směřuje většina klinik a své výsledky z pětidenní kultivace prezentuje i v odborných studiích. Kultivace embryí pouze do 3. dne s následným transferem, nemusí vypovídat o jejich kvalitě s dostatečnými informacemi o vývojovém potenciálu (Racowsky et al., 2000; Luna et al., 2008; Milki et al., 2000; Gardner et al., 2004; Kallen et al., 2010; Sills et al., 2010; Dal Canto et al., 2012). Pětidenní kultivace embryí do stádia blastocysty přináší řadu potenciálních výhod oproti tradiční zkrácené kultivaci. Díky prodloužené kultivaci je možné vyselektovat embrya, která jsou neživotaschopná a zabránit tak transferu těchto embryí. Ze závěru disertační práce mohu jednoznačně potvrdit, že prodloužená kultivace je způsob, kterým se dá zvýšit míra implantace a zlepšit výsledky reprodukce. Tuto teorii potvrzují ve své práci i Mercader et al. (2003) a Gardner et al. (2002; 2004).

V poslední době byly publikovány dvě práce (Ajduk et al., 2011; Swann et al., 2012), ve kterých byly zkoumány cytoplazmatické pohyby vyvolané vstupem spermií, dynamiky tvaru zygoty a funkcí cytoskeletu s cílem zjistit, zda dynamika těchto pohybů může být použita jako predikce dobrého vývoje. Díky neinvazivnímu kontinuálnímu monitoringu, v kombinaci se zobrazovací velocitometrickou analýzou cytoplazmatických dějů po fertilizaci, bylo možné popsat strukturu cytoplazmatických pohybů a predikovat preimplantační kvalitu vývoje embrya (Hardarson et al., 2002). Tento postup ale není v klinické praxi používán pro nutnost invazivního vstupu do embrya. Jako neinvazivní se v klinické praxi využívá, právě monitorovacího systému time-lapse, který umožňuje předvídat vývojový potenciál dělení embrya (Pribenszky et al., 2010 a, b). Pokud jde o

vývojový potenciál, bylo prokázáno, že time-lapse na myších embryích, odhalil při vývoji některé důležité události se silnou prediktivní hodnotou. Wong et al. (2010), prezentoval analýzu time-lapse na stovce rozmrazených zygot, u kterých hodnotil časosběrné snímání vývoje embryí v průběhu vývoje do stádia blastocysty. Výsledky předložené disertační práce se poněkud liší od závěru Wonga et al. (2010), který předvídal schopnost embrya vyvinout se do stádia blastocysty pomocí tří morfokinetických parametrů: (i) délka druhého buněčného cyklu (doba trvání z fáze 2-buněk, fáze cc2); (ii) synchronizace druhého a třetího buněčného dělení (doba do 3-buněčného stádia, fáze s2); a (iii) doba trvání druhého buněčného dělení (tj. cytokineze vedoucí ke vzniku dvou dceřiných buněk, fáze t2). Tato prezentovaná studie (Wong et al., 2010) našla významný statistický rozdíl u hodnot cc2 a s2 mezi embryi, která se vyvinula do stádia blastocysty a těmi, která se nevyvinula. Tyto závěry ve své práci nemohu jednoznačně potvrdit. Pro hodnotu cc2 se ve sledovaném souboru podařilo najít významný rozdíl mezi embryi, která se vyvinula do stádia blastocysty s dobrou morfologickou kvalitou a embryi, která se do stádia blastocysty nedostala. V tomto bodě je možné se závěrem Wonga et al. (2010) souhlasit. Ale hodnota s2 nevykazovala v mém sledovaném souboru v uvedeném parametru statisticky významný rozdíl. Možné vysvětlení pro rozpor v prezentované práci Wonga et al. (2010) může být takové, že zkoumali omezený počet kryokonzervovaných embryí darovaných vědě, která se mohou lišit od čerstvých embryí, která jsou používána v klinické praxi. Wong et al. (2010) nepředložil žádné informace o morfologické kvalitě blastocyst, takže přímé srovnání v tomto případě nelze provést. Naopak v této prezentované disertační práci byla do hodnocení zahrnuta jen embrya s prokazatelnou morfologickou kvalitou a verifikovanou implantací.

Významné rozdíly v cc2 byly dříve prezentovány Meseguerem et al. (2011) pro embrya s dobrým implantačním potenciálem a embrya u kterých došlo k selhání implantace. Na základě výsledků uvedených v disertační práci lze potvrdit závěr Meseguera et al. (2011), že morfokinetický parametr cc2 je důležitým ukazatelem vývojem embrya do stádia blastocysty s dobrou morfologickou kvalitou a dobrým implantačním potenciálem.

V pracích Meseguera et al. (2010) a Hashimota et al. (2012) bylo potvrzeno, že kinetika dělení embryí pomocí time-lapse mikroskopie, může být použita jako nástroj k předvídání vývoje a kvality blastocysty. Sledováním 80 embryí autoři zjistili, že v případě, že doba přechodu mezi 3 až 4-buněčným stádiem vývoje, stejně jako 5 až 8-buněčným stádiem byla kratší, embrya dosáhla častěji stádia blastocysty s dobrou kvali-

tou. Nicméně podobně jako ve výše popsaném případě, vliv těchto údajů je omezen tím, že embrya zahrnutá do studie byla z kryokonzervovaného materiálu a nebyla vybrána k přenosu. Data ukazují, že vývoj se nevztahuje jen na rychlost dělení, ale i na morfologii blastocysty. Dobrá morfologie blastocysty koreluje s lepší synchronizací buněčného dělení oproti embryím, která byla definovaná jako blastocysty se špatnou morfologií (Cruz et al., 2012). Tento závěr je možné potvrdit i zjištěním v předkládané disertační práci.

Tradiční morfologické hodnocení bylo založeno na hodnocení morfologie embrya (Cummins et al., 1986), které bylo postupem času rozšířeno o pozorování vývoje embrya v závislosti na čase, stádiu a kvalitě. Rozhodujícím momentem je den embryotransferu (Rehman et al., 2007). Kontinuálním monitoringem embryí byla odstraněna nutnost častého kontrolování embryí mimo kultivační box, což bylo náročné nejen časově a personálně, ale zvyšoval se i stres embrya při manipulaci mimo kultivační box. Automatický kontinuální monitoring poskytuje množství informací o dynamice dělení embrya. Na základě těchto skutečností je možné identifikovat optimální interval pro každý kinetický parametr tak, aby bylo možné již při časném dělení spolehlivě určit „top“ embrya vhodné k transferu.

Další studie dospěly ke stejným závěrům, tzn. pozitivní vztah mezi kinetikou embrya a schopnost vývoje do stádia blastocysty (Arav et al., 2008; Gonzales et al., 1995). Nedávná studie Meseguera et al. (2011) zkoumala vztah mezi morfokinetickými parametry charakterizující vývoj embryí a následnou implantaci. U 247 embryí, která byla transferována 3. den kultivace po metodě ICSI, našli autoři několik významných rozdílů mezi morfokinetickými parametry a implantací embryí oproti těm, která se neimplantovala. Na základě těchto zjištění navrhli hierarchický model výběru embryí založený na: (i) primární kritéria: načasování dělení na 5 buněk, t_5 ; (ii) sekundární kritéria: synchronní dělení 2 až 4 buňky, s_2 ; a (iii) terciární kritéria: trvání druhého buněčného cyklu, cc_2 . Tato studie měla za cíl vyhodnotit navrhou hierarchii kritérií výběru embryí. Předpovědět vznik blastocysty a následnou etapu implantace. Navržené parametry byly využity i v disertační práci. Na základě našich výsledků je možné potvrdit, že uvedený hierarchický model umožňuje vybrat embrya s vyšší mírou implantace.

Nicméně úspěšná implantace zahrnuje i jiné aspekty, a to zejména úspěšnou aktivaci embryonálního genomu. Tato skutečnost může znamenat, že morfokinetické parametry předpovídající tvorbu blastocysty se mohou lišit od těch, které předpovídají úspěšnou implantaci. Předložené výsledky ukazují, že většina embryí, která prošla dělením

v rámci navrhovaného optimálního časového intervalu pro implantaci, dosáhlo stádia blastocysty. Zejména pro hodnoty t3, t5, s2 a cc2. Další významné rozdíly byly pozorovány v t5. Což v předchozím pozorování potvrdil Meseguer et al. (2011), který popsal t5 jako nejlepší indikátor implantačního potenciálu. Dospěl k závěru, že embrya s t5 od 48,8 do 56,6 h mají nejen vyšší implantační potenciál, ale také vyšší pravděpodobnost vývoje do stádia blastocysty. Tato skutečnost nebyla v mém sledovaném souboru potvrzena. Díky statistickému zhodnocení lze potvrdit významnost času t5 pro vyšší pravděpodobnost vývoje embrya do stádia blastocysty, ale nebyla zde prokázána shoda pro tento čas jako vhodného indikátoru k vyšší míře implantace. Po statistickém zhodnocení se mnou uvedené skupině embryí jeví jako nejdůležitější hodnota pro implantaci čas cc2 (< 11,9 h). Rozdílný výsledek může mít příčinu v použitých kultivačních médiích, jiném managementu laboratoře i ve zvoleném sledovaném souboru. K tomuto závěru se kloní i výsledek nové studie z roku 2015 (Basile et al.), cílem studie bylo ověřit spolehlivost navrhovaných algoritmů Meseguerem et al. (2011). Data byla shromážděna ze čtyř různých klinik, rozdělena do dvou fází, v první byly stanoveny vhodné parametry pro predikci kvalitního embrya. V druhé byly tyto výsledky srovnány na jiné skupině pacientů. Při srovnání všech proměnných jako robustní ukazatel vyšla hodnota t3. Rozdílný výsledek je přičítán sběrem dat s více laboratoří a zapojení více než 40 embryologů, tzn. je zde větší variabilita postupů, která může vést k nestejným výsledkům. Stanovení vhodných morfokinetických parametrů, které povedou k vyšší míře implantace a porodu nelze pravděpodobně vztáhnout paušálně pro všechny IVF laboratoře, ale je třeba je na základě výsledků nastavit individuálně. K podobnému závěru dospěl v nejnovější práci z letošního roku i Kirkegaard et al. (2016).

Časné dělení je velmi dobrým ukazatelem vývojové kompetence v porovnání s pozdě se dělící zygotou (Ziebe et al., 1997; Lundin et al., 2001; Salumets et al., 2003; Van Montfoort et al., 2004). Tyto studie skutečně pozorovaly vyšší podíl blastocyst s dobrou morfologií z embryí s časným dělením. Dle Van Blerkoma (1997) nelze předpokládat, že tato embrya mají vyšší životaschopnost, protože pro implantaci mohou být důležité i další faktory. Tato skutečnost podporuje myšlenku časového okna pro všechna buněčná dělení. Van Blerkom srovnává rychlost vývoje embrya od zygoty po blastocystu. Pro vyhodnocení byla rychlost dělení rozdělena do skupin podle morfokinetického vývoje. Nejvyšší počet blastocyt s kvalitní morfologií se nacházelo v morfokinetické třídě A. Postupně nastával pokles jak vývojového stádia, tak i morfologické kvality embrya až

na nejnižší třídu D. Hodnocení do tříd jasně ukazuje na vztah mezi vývojem embrya do stádia kvalitní blastocysty za určitý čas a implantací.

V prezentované práci byl zvolen stejný model a embrya byla rozdělena do čtyř morfolo-
gických skupin od nejvyšší kvality po kvalitu ve vztahu k morfologii a rychlost dělení
(A, B, C, D), jak je navrhl Meseguer et al. (2011). Po vyhodnocení sledovaného souboru
embryí lze konstatovat shodný závěr - rozdělení do tříd souvisí se vztahem mezi vý-
vojem embrya v určitém čase a následnou implantací.

I když se morfokinetika jeví jako slibný faktor k výběru vhodného embrya, je zde stále
mnoho dalších faktorů, které ovlivňují vývoj a implantaci embryí a jsou neznámé - např.
porozumění efektu léčebných parametrů, jako jsou stimulační protokoly, kultivační mé-
dia, inkubační podmínky a manipulace s embryi (Gardner et al., 2002; Neuber et al.,
2003; Sifer et al., 2009; Wale a Gardner, 2010; Basile et al., 2015; Kirkegaard et al.,
2016).

Mezi možné příčiny odchýlení embrya od optimálního průběhu dělení lze také zařadit
aneuploidie a genetické poruchy. Morfokinetika není stoprocentní zárukou pro výběr
zdravého embrya, ale bylo zjištěno, že u embryí, která vykazovala odchylky v dělení,
byl vyšší výskyt aneuploidii (Jones et al., 1998; Fragouli et al., 2011; Montag et al.,
2011; Rubio et al., 2012). Při srovnání námi prezentovaných výsledků s výsledky ostat-
ních autorů je možné říci, že morfokinetické parametry mohou zlepšit výběr geneticky
normálních a životaschopných embryí a tím snížit potřebu invazivních zásahů do inte-
grity embrya. Je však třeba dalších výzkumů, které potvrdí jednoznačnou výhodu konti-
nuálního monitoringu a určitou spolehlivost v časových proměnných pro výběr embrya
s nejvyšším implantačním potenciálem tak, aby bylo možné s větší jistotou zvýšit
úspěšnost IVF léčby, umožnit transfer jednoho „top“ embrya a zabránit komplikacím
při vícečetných těhotenstvích.

7 ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že kontinuální monitoring embryí poskytuje mnoho cenných informací o vývoji embryí a díky speciálnímu softwaru pro obrazovou analýzu EmbryoViewer (UnisenseFertiliTech, Dánsko), lze velmi dobře vyhodnotit jednotlivé časové pochody ve vývoji. Po zhodnocení celého sledovaného souboru je možné říci, že byla nalezena časová proměnná, která se jeví jako důležitý indikátor k predikci vývoje embrya do stádia kvalitní blastocysty, vyšší míry implantace a vyšší šance na porod živého dítěte. Touto časovou proměnou je hodnota cc2, tzn. označení času, kdy embryo setrvalo ve 2-buněčném stádiu k vydělení do 3-buněčného stádia. Optimální hodnota stanovena pro $cc2 < 11,9$ h. V druhé fázi hodnocení byly reálné naměřené hodnoty porovnány s navrženými optimálními hodnotami dle Meseguera et al. (2011), zde nebyla nalezena žádná společná časová proměnná, která by byla statisticky významná pro predikci kvalitní blastocysty, implantaci embrya a následného porodu živého dítěte. Ve své práci Meseguer et al. (2011) popsal hodnotu t5 jako nejlepší indikátor vývoje embrya do stádia blastocysty a implantačního potenciálu, který nebyl ve sledovaném souboru potvrzen. Nelze vyloučit, že výsledek může být ovlivněn použitým kultivačním médiem (Ciray et al., 2012). V současné době nebyl zkoumán vliv zvoleného typu kultivačního média v závislosti na navržených optimálních časových kritériích a v důsledku toho je ještě stále nejasné, zda navržená kritéria Meseguerem (2011) jsou všeobecně použitelná. Po zhodnocení naměřených dat, a srovnání s již navrženými optimálními hodnotami, lze ale jednoznačně říci, že embrya s rychlejším vývojovým potenciálem zvyšují šanci na úspěšnou léčbu párům, které podstupují *in vitro* fertilizaci. Časné dělení embrya je velmi silným biologickým indikátorem vývojového potenciálu embrya a může být použito jako spolehlivý indikátor pro výběr vhodného embrya po metodě ICSI.

7.1 Uplatnění v praxi

Možnost kontinuálního pozorování embryí, jejich životaschopnosti a růstového potenciálů je velkým přínosem pro embryologickou laboratoř. Metoda time-lapse, která zachycuje vývoj embryí prostřednictvím kamerového systému, je neinvazivní metoda sledování embryí během celé doby jejich kultivace v podmínkách *in vitro*. Je možné shromažďovat kvantitativní a kvalitativní informace o každém embryu, aniž bychom narušovali kultivační podmínky.

Spolehlivý výběr životaschopných embryí pro transfer je klíčovým faktorem při stanovení úspěšnosti léčby IVF. Prodloužená kultivace embryí *in vitro* až do pátého dne, spolu s kontinuálním monitoringem vývoje embryí v laboratorních podmínkách, je slibným nástrojem pro predikci kvalitní blastocysty, a s tím související výběr embrya s nejvyšší šancí implantace pro transfer a následný porod při léčbě pomocí asistované reprodukce.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Aboulghar M.A., Mansour R.T., Serour G.I., Amin Y.M., 1995: The role of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the treatment of patients with borderline semen. *Hum Reprod*, 10, 2829 - 2830

Aboulghar M.A., Mansour R.T., Serour G.I., Sattar M.A., Amin Y.M., 1996: Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and borderline semen. *J Assist Reprod Genet*, 13, 38 - 42

Ajduk A., Ilozue T., Windsor S., Yu Y., Seres K.B., Bomphrey R.J., Tom B.D., Swann K., Thomas A., Graham C., Zernicka-Goetz M., 2011: Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nat Commun*, 2, 417

Alikani M., 2007: The origins and consequences of fragmentation in mammalian eggs and embryos. In: Elder, K., Cohen, J. (Eds.), *Preimplantation Embryo Evaluation and Selection*. Informa Press, London, 89 - 100

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. *Hum Reprod*, 15, 2634 - 2643

Alikani M., Cohen J., Tomkin G., Garrisi G.J., Mack C., 1999: Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*, 71, 836 - 842

Andersen A.N., Goossens V., Ferraretti A.P., Bhattacharya S., Felberbaum R., de Mouzon J., Nygren K.G., 2008: Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 23, 756 - 771

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011: The Istanbul consensus workshop on embryo assessments: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*, 26, 1270 - 1283

Arav A., Aroyo A., Yavin S., Roth Z., 2008: Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis. *Reprod Biomed Online*, 17, 669 - 675

Azzarello A., Hoest T., Mikkelsen A.L., 2012: The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod*, 27, 2649 - 2657

Balaban B., Urman B., Isiklar A., Alatas C., Aksoy S., Mercan R., Mumcu A., Nuhoglu A., 2001: The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod*, 16, 2357 - 2361

Basile N., Meseguer M., 2012: Time-lapse technology: evaluation of embryo quality and new markers for embryo selection. *Expert Rev Obstet Gynecol*, 7, 175

Basile N., Vime P., Florensa M., Aparicio Ruiz B., García Velasco J.A., Remohí J., Meseguer M., 2015: The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*, 30, 276 - 283

Blahova E., Machal J., Machal V., Milaković I., Hanulakova S., 2014: Eliminating the effect of pathomorphologically formed sperms on resulting gravidity using the Intracytoplasmic Sperm Injection method. *Exp Ther Med*, 7, 1000 - 1004

Blake D.A., Farquhar C.M., Johnson N., Proctor M., 2007: Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD002118

Bos-Mikich A., Mattos A.L., Ferrari A.N., 2001: Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod*, 16, 8 - 2661

Braude P., Bolton V., Moore S., 1988: Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 332, 459 - 461

Ciray H.N., Aksoy T., Goktas C., Ozturk B., Bahceci M., 2012: Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet*, 29, 891 - 900

Ciray H.N., Ulug U., Tosun S., Erden, H.F., Bahceci M., 2006: Outcome of 1114 ICSI and embryo transfer cycles of women 40 years of age and over. *Reprod Biomed Online*, 13, 516 - 522

Cobo A., Meseguer M., Remohí J., Pellicer A., 2010: Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod*, 25, 2239 - 2246

Cohen J., 1991: Assisted hatching of human embryos. *Review J In Vitro Fert Embryo Transf*, 8, 179 - 190

Cohen J., Alikani M., Munne S., Palermo G.D., 1994: Micromanipulation in clinical management of infertility disorders. *Semin Reprod Endocrinol*, 12, 151 - 168

Cummins J.M., Breen T.M., Harrison K.L., Shaw J.M., Wilson L.M., Hennessey J.F., 1986: A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 3, 284 - 295

Cruz M., Gadea B., Garrido N., Pedersen K.S., Martinez M., Perez-Cano I., Muñoz M., Meseguer M., 2011: Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet*, 28, 569 - 573

Cruz M., Garrido N., Herrero J., Perez-Cano I., Munoz M., Meseguer M., 2012: Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*, 25, 371 - 381

Dal Canto M., Coticchio G., Mignini Renzini M., De Ponti E., Novara P.V., Brambillasca F., Comi R., Fadini R., 2012: Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online*, 25, 474 - 480

Dylevský I., 2011: *Základy funkční anatomie člověka*, nakladatelství Poznání, 1 - 332, ISBN-13: 978-80-87419-06-9

Ebner T., Yaman C., Moser M., Sommergruber M., Feichtinger O., Tews G., 2000: Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15, 427 - 430

Edwards R.G., Fishel S.B., Cohen J., Fehilly C.B., Purdy J.M., Slater J.M., Steptoe P.C., Webster J.M., 1984: Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1, 3 - 23

Enginsu M.E., Dumoulin J.C., Pieters M.H., Evers J.L. and Geraedts J.P., 1993: Predictive value of morphologically normal sperm concentration in the medium for in-vitro fertilization. *Int J Androl*, 16, 113 - 120

Fenwic, J., Platteau P., Murdoch A.P., Herbert M., 2002: Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod*, 17, 407 - 412

Fisch J.D., Rodriguez H., Ross R., Overby G., Sher G., 2001: The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod*, 16, 1970 - 1975

Fragouli E., Wells D., 2011: Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenet Genome Res*, 133, 149 - 159

Gardner D.K., Lane M., Schoolcraft W.B., 2002: Physiology and culture of the human blastocyst. *J Reprod Immunol*, 55, 85 - 100

Gardner D. K., Surrey E., Minajarez D., Leitz A., Stevens J., Schoolcraft W.B., 2004: Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*, 81, 551 - 555

Gardner D.K., Vella P., Lane M., Wagley L., Schlenker T., Schoolcraft W.B., 1998: Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*, 69, 84 - 88

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

Gonzales D.S., Pinheiro J.C., Bavister B.D., 1995: Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle. *J Reprod Fertil*, 105, 1 - 8

Graham J., Han T., Porter R., Levy M., Stillman R., Tucker M. J., 2000: Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril*, 74, 495 - 497

Hardarson T., Hanson C., Sjogren A., Lundin K., 2001: Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*, 16, 313 - 318

Hardarson T., Lofman C., Coull G., Sjogren A., Hamberger L., Edwards R.G., 2002: Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod Biomed Online*, 5, 36 - 38

Hashimoto S., Kato N., Saeki K., Morimoto Y., 2012: Selection of high-potential embryos by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril*, 97, 332 - 337

Hesters L., Prisant N., Fanchin R., Mèndez Lozano D.H., Feyereisen E., Frydman R., Tachdjian G., Frydman N., 2008: Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril*, 89, 1677 - 1684

Jelínek P., Koudela K., 2003: Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1 - 409, ISBN 80-7157-644-1

Jelínek R., Dostál M., Likovský Z., Halašková M., Maňáková E., Peterka M., Peterková R., Titlbach M., Velický J., Zemanová Z., 2000: Skripta Histologie a embryologie.

[Citováno 5. 5. 2014]. Dostupné na World Wide Web:

<http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>

Jones G.M., Trounson A.O., Lalotgis N., Wood C., 1998: Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*, 70, 1022 - 1029

Kallen B., Finnstrom 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

Kirkegaard K., Agerholm I.E., Ingerslev H.J., 2012: Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod*, 27, 1277 - 1285

Kirkegaard K., Sundvall L., Erlandsen M., Hindkjær J.J., Knudsen U.B., Ingerslev H.J., 2016: Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. *Hum Reprod*, 31, 324-331

Kobilková J., Jirásek J.E., Martan A., Mašata J., Živný J., 2005: Základy gynekologie a porodnictví. Galén, 1 - 368, ISBN-10: 80-7262-315-X

Langley M.T., Marek D.M., Gardner D.K., Doody K.M., Doody K.J., 2001: Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Hum Reprod*, 16, 902 - 908

Lemmen J.G., Agerholm I., Ziebe S., 2008: Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*, 17, 385 - 391

Louda F., 2001: Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnologických metod. ČZU Praha, 1 - 224, ISBN 80-213-0702-1

Luna M., Copperman A.B., Duke M., Ezcurra D., Sandler B., Barritt J., 2008: Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 (10 cells), bringing into question current embryological dogma. *Fertil Steril*, 89, 358 - 363

Lundin K., Bergh C., Hardarson T., 2001: Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*, 16, 2652 - 2657

Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P., Lappi M., Ruberti A., Farfalli V., 2007: Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril*, 87, 534 - 541

Manor D., Drugan A., Stein D., Pillar M., Itskowitz-Eldor J., 1999: Unequal pronuclear size a powerful predictor of embryonic chromosome anomalies. *J Assist Reprod Genet*, 16, 385 - 389

McKiernan S.H., Bavister B.D., 1994: Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod*, 9, 2123 - 2129

Mercader A., Garcia-Velasco J.A., Escudero E., Remohí J., Pellicer A., Simón C., 2003: Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril*, 80, 1162 - 1168

Meseguer M., Herrero J., Tejera A., de los Santos M.J., Escrich L., Garrido N., Ramsing N., 2010: Embryos with too early first cleavage fail to implant; correlation between exact timing of first cleavage and successful implantation. *Hum Reprod*, 2, 58 - 59

Meseguer M., Herrero J., Tejera A., Hilligsoe K.M., Ramsing N., Remohi J., 2011: The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*, 26, 2658 - 2671

Meseguer M., Rubio I., Cruz M., Basile N., Marcos J., Requena A., 2012: Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril*, 98, 1481 - 1489

Milki A.A., Hinckley M.D., Fisch J.D., Dasig D., Behr B., 2000: Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril*, 73, 126 - 129

Montag M., Liebenthron J., Koster M., 2011: Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta*, 32, 252 - 256

Moore K.L., Persaud T.N., 1998: *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 6th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1 - 564

Nagy Z.P., Liu J., Joris H., Verheyen G., Tournaye H., Camus M., Derde M.C., Devroey P., Van Steirteghem A.C., 1995: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod*, 10, 1123 - 1129

Nakahara T., Iwase A., Goto M., Harata T., Suzuki M., Ienaga M., Kobayashi H., Takikawa S., Manabe S., Kikkawa F., Ando H., 2010: Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet*, 27, 93 - 96

Neuber E., Rinaudo P., Trimarchi J.R., Sakkas D., 2003: Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod*, 18, 1307 - 1312

Oh S.J., Gong S.P., Lee S.T., Lee E.J., Lim J.M., 2007: Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. *Fertil Steril*, 88, 1150 - 1157

Ottosen L.D., Hindkjaer J., Ingerslev J., 2007: Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet*, 24, 99 - 103

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C., 1992: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17 - 18

Palmstierna M., Murkes D., Csemiczky G., Andersson O., Wramsby H., 1998: Zona pellucida thickness variation and occurrence of visible mononucleated blastomeres in preembryos are associated with a high pregnancy rate in IVF treatment. *J Assist Reprod Genet*, 15, 70 - 75

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. *Hum Reprod*, 12, 532 - 541

Pelinck M.J., De Vos M., Dekens M., Van der Elst J., De Sutter P., Dhont M., 1998: Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13, 960 - 963

Perinaud J., Mieuisset R., Vietez G., Labal B., Richoilley G., 1993: Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril*, 60, 888 - 892

Pinborg A., 2005: IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum Reprod Update*, 11, 575 - 593

Pribenszky C., Losonczi E., Molnár M., Lang L., Mátyás S., Rajczy K., Molnár K., Kovács P., Nagy P., Conceicao J., Vajta G., 2010a: Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online*, 20, 371 - 379

Pribenszky C., Mátyás S., Kovács P., Losonczy E., Zádori J., Vajta G., 2010b: Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online*, 21, 533 - 536

Racowsky C., Jackson K.V., Cekleniak N.A., Fox J.H., Hornstein M.D., Ginsburg E.S., 2000: The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or 5 transfer. *Fertil Steril*, 73, 558 - 564

Racowsky C., Stern J.E., Gibbons W.E., Behr B., Pomeroy K.O., Biggers J.D., 2011: National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. *Fertil Steril*, 95, 1985 - 1989

Rehman K.S., Bukulmez O., Langley M., Carr B.R., Nackley A.C., Doody K.M., Doody K.J., 2007: Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril*, 87, 1041 - 1052

Rubio I., Kuhlmann R., Agerholm I., Kirk J., Herrero J., Escribá M.J., Bellver J., Mesequer M., 2012: Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril*, 98, 1458 - 1463

Sakkas D., Percival G., D'Arcy Y., Sharif K., Afnan M, 2001: Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril*, 76, 1150 - 1156

Sakkas D., Shoukir Y., Chardonens 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. *Hum Reprod*, 13, 182 - 187

Salumets A., Hyden-Granskog C., Suikkari A.M., Tiitinen A., Tuuri T., 2001: The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod*, 16, 2177 - 2181

Salumets A., Hyden-Granskog C., Makinen S., Suikkari A.M., Tiitinen A., Tuuri T., 2003: Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod*, 18, 821 - 825

Scott L., 2003: The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*, 9, 237 - 249

Scholtes M.C., Zeilmaker G.H., 2006: A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 61, 521 - 525

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. *Hum Reprod*, 12, 1531 - 1536

Sills E.S., Palermo G.D., 2010: Human blastocyst culture in IVF: current laboratory applications in reproductive medicine practice. *Rom J Morphol Embryol*, 51, 441 - 445

Sifer C., Handelsman D., Grange E., Porcher R., Poncelet C., Martin-Pont B., Benzacken B., Wolf J.P., 2009: An auto-controlled prospective comparison of two embryos culture media (G III series versus ISM) for IVF and ICSI treatments. *J Assist Reprod Genet*, 26, 575 - 581

Suchá, R. et al., 2002: Dlouhý a krátký stimulační protokol v IVF, hormonální hladiny ve folikulární tekutině a v séru. *Praktická gynekologie*, 4, 22 - 25

Swann K., Windsor S., Campbell K., Elgmati K., Nomikos M., Zernicka-Goetz M., Amso N., Lai F.A., Thomas A., Graham C., 2012: Phospholipase C-zeta-induced Ca(2+) oscillations cause coincident cytoplasmic movements in human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 97, 742 - 747

Terriou P., Giorgetti C., Hans E., Salzmann J., Charles O., Cignetti L., Avon C., Roulier R., 2007: Relationship between even early cleavage and day 2 embryo score and assessment of their predictive value for pregnancy. *Reprod Biomed Online*, 14, 294 - 299

Tesarik J., Greco E., 1999: The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*, 14, 1318 - 1323

Tesarik J., Greco E., Mendoza C., 2004: Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*, 19, 611 - 615

Trávník, P., Čech, S., 2011: *Základy obecní a speciální embryologie pro klinické embryology*. YBUX, Brno, 1 - 141

Tsai Y.C., Chung M.T., Sung Y.H., Tsai T.F., Tsai Y.T., Lin L.Y., 2002: Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynecol Obstet*, 76, 293 - 297

Vacek Z., 2006: *Embryologie*. Grada, Praha, 2006, 1 – 255, ISBN 978-80-247-1267-3

Van Blerkom J., 1997: Can the developmental competence of early human embryos be predicted effectively in the clinical IVF laboratory? *Hum Reprod*, 12, 1610 - 1614

Van Montfoort A.P., Dumoulin J.C., Kester A.D., Evers J.L., 2004: Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod*, 19, 2103 - 2108

Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D., Valkenburg M., Van de Meerssche M., Ryckaert G., Eestermans W., Gerris J, 1999: Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod*, 14, 2345 - 2349

Van Steirteghem A.C., Liu J., Joris H., Nagy Z., Janssenswillen C., Tournaye H., Derde M.P., Van Assche E., Devroey P., 1993: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod, 8, 1055 - 1060

Wale P.L., Gardner D.K., 2010: Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. Reprod Biomed Online, 21, 402 - 410

Walsh A.P., Shkrobot L.V., Coull G.D., Peirce K.L., Walsh D.J., Salma U., Sills E.S., 2009: Blastocyst transfer for multiple prior IVF failure: a five year descriptive study. Ir Med J, 102, 282 - 285

World Health Organisation, 2010: WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. FIFTH EDITION, WHO Press, Geneva, Switzerland, 1 - 271

Wong C.C., Loewke K.E., Bossert N.L., Behr B., De Jonge C.J., Baer T.M., Reijo Pera R.A., 2010: Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. Nat Biotechnol, 28, 1115 - 1121

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. Hum Reprod, 12, 1545 - 1549

Internetové zdroje:

Trávník P., 2009: Gametogeneze, mitóza a meióza. Dostupné na: <http://www.are.cz>. [Citováno 20. 2. 2010]

Morfologická stavba spermie (zdroj: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spermie>)

9 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

9.1 Seznam obrázků

- Obr. 1: Morfologická stavba spermie
- Obr. 2: Ultrazvukový obraz nastimulovaného ovária
- Obr. 3: Oocyt obklopený kumulárními buňkami
- Obr. 4: Nezralý oocyt (fáze GV)
- Obr. 5: Oocyt ve fázi MI
- Obr. 6: Zralý oocyt ve fázi MII
- Obr. 7: Intracytoplazmatická injekce spermie do cytoplazmy zralého vajíčka
- Obr. 8a: Navázané spermie
- Obr. 8b: Výběr spermií
- Obr. 9: Mechanický asistovaný hatching u třídenního embrya
- Obr. 10: Asistovaný hatching embrya pomocí laseru před (A) a po provedení (B)
- Obr. 11: Metoda ICSI
- Obr. 12: Mikromanipulátor Research Instruments
- Obr. 13: Laminární box pro manipulaci se zárodečnými buňkami a embryi
- Obr. 14: Kultivační boxy pro uchování zárodečných buněk před ICSI
- Obr. 15: Kultivační systém EmbryoScope
- Obr. 16: Kultivační miska Embryoslide v systém EmbryoScope
- Obr. 17: Vývoj embryí od 1. do 4. dne kultivace
- Obr. 18: Hodnocení blastocyst dle stádia
- Obr. 19: Hierarchická klasifikace embryí

9.2 Seznam tabulek

- Tab. 1: Hodnocení embryí v průběhu kultivace od druhého do čtvrtého dne
- Tab. 2: Konsenzus hodnotícího systému blastocyst (AlphaScientists, 2011)
- Tab. 3: Statistické zhodnocení reálných časů dělení embryí do stádia B a GMB
- Tab. 4: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2
- Tab. 5: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3

- Tab. 6: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5
- Tab. 7: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2
- Tab. 8: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2
- Tab. 9: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2
- Tab. 10: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3
- Tab. 11: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5
- Tab. 12: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2
- Tab. 13: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2
- Tab. 14: Statistické zhodnocení implantace v reálných časech
- Tab. 15: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2
- Tab. 16: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3
- Tab. 17: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5
- Tab. 18: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2
- Tab. 19: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2
- Tab. 20: Statistické zhodnocení porodu živého dítěte v reálných časech
- Tab. 21: Statistické vyhodnocení reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5
- Tab. 22: Stanovení optimální časové proměnné
- Tab. 23: Hierarchická klasifikace embryí v závislosti na porodu živého dítěte

9.3 Seznam grafů

- Graf 1: Analýza celého souboru v čase t2 a procentuální zastoupení embryí v čase t2 v optimálním rozmezí.
- Graf 2: Analýza celého souboru v čase t3 a procentuální zastoupení embryí v čase t3 v optimálním rozmezí
- Graf 3: Analýza celého souboru v čase t5 a procentuální zastoupení embryí v čase t5 v optimálním rozmezí.
- Graf 4: Analýza celého souboru v čase cc2 a procentuální zastoupení embryí v čase cc2 v optimálním rozmezí
- Graf 5: Analýza celého souboru v čase s2 a procentuální zastoupení embryí v čase s2 v optimálním rozmezí
- Graf 6: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2

- Graf 7: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3
- Graf 8: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5
- Graf 9: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2
- Graf 10: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2
- Graf 11: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2
- Graf 12: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3
- Graf 13: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5
- Graf 14: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2
- Graf 15: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2
- Graf 16: Implantace embryí v reálném čase t2
- Graf 17: Implantace embryí v reálném čase t3
- Graf 18: Implantace embryí v reálném čase t5
- Graf 19: Implantace embryí v reálném čase cc2
- Graf 20: Implantace embryí v reálném čase s2
- Graf 21: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t2
- Graf 22: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t3
- Graf 23: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5
- Graf 24: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase cc2
- Graf 25: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase s2
- Graf 26: Porovnání reálných časů vs. optimální rozmezí v čase t5