



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Vliv mikrofluidní separace spermií na úspěch IVF  
terapie

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA](#)

**Autor:** Pavla Nováková

**Vedoucí práce:** Mgr. Lukáš Gold

České Budějovice 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Vliv mikrofluidní separace spermií na úspěch IVF terapie*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2024

### **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Lukášovi Goldovi za přínosné a cenné připomínky a rady v průběhu jejího vzniku. Velké poděkování patří i mým kolegyním z embryologické laboratoře IVF centra Next Fertility IVF prof. Zech Pilsen s.r.o. a také mé rodině za jejich velkou podporu během celého mého studia.

# Vliv mikrofluidní separace spermií na úspěch IVF terapie

## Abstrakt

Do center asistované reprodukce přichází stále více párů, které mají problémy s početím. Přes prvotní snahu o zlepšení životního stylu a snížení každodenního stresu, mohou být problémy s otěhotněním a donošením zdravého dítěte způsobené jedním nebo kombinací více faktorů a v takových případech neplodné páry volí cestu asistované reprodukce. Dříve se o oblasti reprodukční medicíny pozornost soustředila zejména na příčiny neplodnosti na straně ženy. V posledních letech se asistovaná reprodukce zaměřuje z velké části i na oblast andrologie. V tomto ohledu došlo k rozvoji metod rozšířeného spermioqramu a technik zpracování spermií. Současným trendem metod reprodukční embryologie a andrologie je co nejvíce napodobit prostředí *in vivo*. Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda má metoda mikrofluidní separace spermií vliv na jejich kvalitu a zda má použití takto získaných spermií vliv na úspěch IVF léčby.

Pro splnění cílů této práce byla použita data od 129 párů, které podstoupily v našem IVF centru léčbu pomocí darovaných oocytů a zároveň u nich byly použity spermie z čerstvého ejakulátu. Vzorky spermií byly rozděleny do dvou skupin, a to pro zpracování třístupňovou gradientovou centrifugací a separací pomocí mikrofluidního chipu ZyMot. Spermie byly následně použity pro *in vitro* fertilizaci metodou intracytolazmatické injekce spermie do oocytu. Cykly s darovanými oocyty byly vybrány z důvodu minimalizace vlivu ženského faktoru.

Výsledky této práce ukazují na skutečnost, že zpracování spermií metodou mikrofluidního chipu má pozitivní vliv na úspěch IVF terapie.

## Klíčová slova

asistovaná reprodukce; andrologie; *in vivo*; mikrofluidní separace spermií; gradientová centrifugace; *in vitro* fertilizace; intracytoplazmatická injekce spermie

# **The effect of microfluidic sperm separation on the success of IVF therapy**

## **Abstract**

More and more couples are coming to assisted reproduction centres to solve conception problems. Despite initial efforts to improve lifestyle and reduce daily stress, problems in conceiving and delivering a healthy baby can be caused by one or a combination of multiple factors, and in such cases infertile couples opt for assisted reproductive treatment. In earlier times, the focus in the field of reproductive medicine was mainly on female fertility. In recent years, assisted reproductive medicine has largely focused on the field of andrology. In this regard, the development of enhanced spermogram methods and sperm processing techniques has been developed. The current trend in reproductive embryology and andrology methods is to mimic the *in vivo* environment as much as possible. The aim of this bachelor's thesis was to determine whether the method of microfluidic sperm separation has an effect on sperm quality and whether the use of sperm obtained in this way influences the success of IVF treatment.

In order to achieve the objectives of this study, data from 129 couples who underwent treatment in our IVF centre by donated oocytes and at the same time sperm from fresh ejaculate were used. The sperm samples were divided into two groups, namely for processing by gradient centrifugation and separation by microfluidic chip. The sperm were then used for *in vitro* fertilization using intracytoplasmic sperm injection method. Cycles with donated oocytes were selected to minimize the influence of female factor.

The results of this work indicate that sperm processing by microfluidic chip method has a positive impact on the success of IVF treatment.

## **Key words**

assisted reproduction; andrology; *in vivo*; microfluidic sperm separation; gradient centrifugation; *in vitro* fertilization; intracytoplasmic injection of sperm

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>9</b>
2.1	Fyziologie spermatogeneze a spermií	9
2.1.1	Stavba a funkce mužského pohlavního ústrojí	9
2.1.1.1	Varle (testis)	9
2.1.1.2	Šourek (scrotum)	9
2.1.1.3	Nadvarle (epididymis)	10
2.1.1.4	Předstojná žláza (prostata)	10
2.1.1.5	Semenné vāčky (vesiculae seminales)	10
2.1.1.6	Pyj (penis)	10
2.1.2	Spermatogeneze	10
2.1.3	Stavba spermie	13
2.1.3.1	Hlavička	13
2.1.3.2	Krček (střední část)	14
2.1.3.3	Bičík	14
2.2	Patofyziologie spermatogeneze a spermií	14
2.2.1	Abnormality spermií	15
2.3	Spermiogram	15
2.3.1	Normozoospermie	15
2.3.2	Abnormality spermiogramu	16
2.4	Fyziologie procesu fertilizace a časného embryonálního vývoje	17
2.5	Techniky separace spermií v asistované reprodukci	22
2.5.1	Hodnocení spermiogramu	22
2.5.2	Centrifugační techniky	22
2.5.2.1	Prostá centrifugace	22
2.5.2.2	Gradientová centrifugace	22
2.5.3	Techniky separace založené na aktivním pohybu	23
2.5.3.1	Swim up	23
2.5.4	Techniky založené na průchodu speciálním prostředím	23
2.5.5	Techniky cílené separace spermií	23
2.6	Metody asistované reprodukce	23
2.6.1	Intrauterinní inseminace	24

2.6.2	Klasická IVF .....	24
2.6.3	ICSI.....	24
2.6.4	IMSI.....	25
2.6.5	PICSI.....	25
2.7	Kultivace embryí.....	25
2.7.1	Délka kultivace .....	26
2.7.2	Kultivační médium .....	26
2.7.3	Kultivační systémy .....	26
2.7.4	Transfer embrya – embryotransfer .....	27
<b>3</b>	<b>Praktická část.....</b>	<b>28</b>
3.1	Metoda přípravy spermií pomocí mikrofluidního chipu ZyMot .....	28
3.1.1	Použité materiálové a přístrojové pomůcky.....	28
3.1.2	Vlastní provedení .....	28
3.2	Metoda přípravy spermií gradientovou centrifugací .....	29
3.2.1	Použité materiálové a přístrojové pomůcky.....	29
3.2.2	Vlastní provedení .....	30
3.3	Metody invazivního oplození in vitro.....	30
3.3.1	Použité materiálové a přístrojové pomůcky.....	30
3.3.2	Vlastní provedení .....	31
3.4	Hodnocené parametry .....	31
3.5	Popis statistických metod.....	32
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zdrojů.....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Seznam obrázků a příloh .....</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>43</b>
<b>10</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>44</b>
<b>11</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>45</b>

## 1 Úvod

Problematikou neplodnosti se lidé zabývají již od nepaměti. Největším milníkem v tomto oboru bylo bezpochyby narození Luisy Brownové – prvního dítěte „ze zkumavky“ v roce 1978 v Anglii. Tato úspěšná *in vitro* fertilizace se podařila týmu profesora Roberta Edwardse a Patricka Steptoea. (Dow, 2017)

V naší zemi se první dítě pomocí metod asistované reprodukce narodilo v tehdejším Československu v roce 1982 v centru profesora Ladislava Pilky. (Trávník, 2011)

Dětí narozených za pomoci metod asistované reprodukce stále přibývá. Cílem odborníků v oblasti reprodukční medicíny je snaha co nejšetrněji napodobit proces přirozeného početí. K tomu je zapotřebí kvalitních oocytů a spermií. V několika posledních desetiletích ukazují mnohé studie na zhoršující se kvalitu ejakulátu. Andrologický faktor se na příčině neplodnosti podílí z 20 až 45 %. Proto je třeba se v andrologické laboratoři zaměřit na přípravu vzorků spermií metodami, které co nejlépe zaručují výběr nejkvalitnějších spermií pro oplození.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Fyziologie spermatogeneze a spermií

#### 2.1.1 Stavba a funkce mužského pohlavního ústrojí

##### 2.1.1.1 Varle (*testis*)

Varle je elipsoidní párový orgán, v jehož stočených kanálcích (*tubuli seminiferi contorti*) vznikají spermie v průběhu spermatogeneze řízené sekrecí gonadotropních hormonů. Intersticiální Leydigovy buňky zajišťují zvýšenou koncentraci testosteronu, která je nezbytná pro tvorbu spermií. Délka semenotvorných stočených kanálků může celkově dosahovat až 250 m. Řídké kolagenní vazivo obsahuje kromě těchto kanálků a Leydigových buněk i krevní cévy a nervy. Krevní zásobení zajišťuje *arteria testicularis* a nervové funkce probíhají v pleteni *plexus testicularis*. Základ zárodečného epitelu stočených kanálků tvoří Sertoliho buňky, které prostupují celou tloušťku epitelu. Nasedají na *lamina basalis* a jejich četné výběžky obklopují vyvíjející se spermie. Jejich hlavní funkcí je výživa, podpora a ochrana spermií, regulace spermatogeneze, sekrece testikulární tekutiny obsahující bílkoviny, steroidy, proteiny a ionty a v neposlední řadě zajišťují i fagocytózu. Na periferii kanálku se u bazální membrány nacházejí spermatogonie (primitivní zárodečné buňky), dále pak směrem od *lamina basalis* spermatocyty I a II, spermatidy, a nakonec nově vznikající spermie. Všechny tyto zmíněné buňky spermatogeneze jsou zanořeny v cytoplazmě Sertoliho buněk. (Trávník, 2018)

##### 2.1.1.2 Šourek (*scrotum*)

Tento kožní vak obklopující varle, nadvarle a část semenného provazce se nachází za kořenem penisu. Je rozdělen vazivovou přepážkou na dvě dutiny, z nichž každá obsahuje jedno varle s obaly. Jeho nejdůležitější funkcí je udržování teploty varlete, nižší o 2 °C, než je teplota těla. Tento proces probíhá svrašťováním a povolováním hladkých svalových buněk, které podle okolní teploty spolu s potními žlázami a cévním systémem teplotu varlat regulují. (Trávník, 2011)

### **2.1.1.3 Nadvarle (*epididymis*)**

Nadvarle je umístěno na horní a zčásti i na zadní straně varlete a dále přechází do chámovodu (*ductus deferens*). Z 8 až 12 vývodných stočených kanálků (*ductuli efferentes*) následně vzniká jeden mnohonásobně stočený vývod (*ductus epididymidis*). V nadvarleti dochází k dozrávání spermií a po dobu přibližně 14 dnů slouží jako jejich zásobárna. (Trávník, 2022)

### **2.1.1.4 Předstojná žláza (*prostata*)**

Tato žláza je uložena v malé pánvi a prochází jí močová trubice. Pod vazivovým obalem se nachází 30 až 50 tubuloalveolárních rozvětvených žlázek, které produkují prostatický sekret tvořící přibližně 30 % objemu ejakulátu. Obsahuje složky důležité pro správnou funkci spermií a jeho sekrece je závislá na testosteronu. Jeho pH je přibližně 6,4. (Trávník, 2011)

### **2.1.1.5 Semenné váčky (*vesiculae seminales*)**

Tyto malé žlázy jsou tvořeny seskupením různě rozšířených tubulů. Povrch jejich sliznice tvoří četné řasy pokryté cylindrickým epitelem a zanořené pohárkové buňky tvořící alkalický sekret, který se podílí z více než 70 % na objemu ejakulátu a upravuje jeho pH. Tato sekrece je závislá na koncentraci testosteronu. (Trávník, 2011)

### **2.1.1.6 Pyj (*penis*)**

Penis je mikční a kopulační orgán, který tvoří dvě rovnoběžná topořivá válcovitá tělesa a jeden *corpus spongiosum*, kterým probíhá močová trubice. Malé kaverny topořivých těles se při erekci naplňují krví na základě aktivace viscerálního reflexu v míšních segmentech S2-S4. (Trávník 2011)

## **2.1.2 Spermatogeneze**

Spermatogeneze (obr. 1) je proces vzniku spermie, který je řízen sekrecí gonadotropních hormonů. Intersticiální Leydigovy buňky lokálně zajišťují vysokou koncentraci testosteronu. Prostřednictvím mitotického dělení se spermatogonická kmenová buňka diferencuje do spermatocytu. Následným meiotickým dělením dochází ke vzniku spermií ze spermatid.

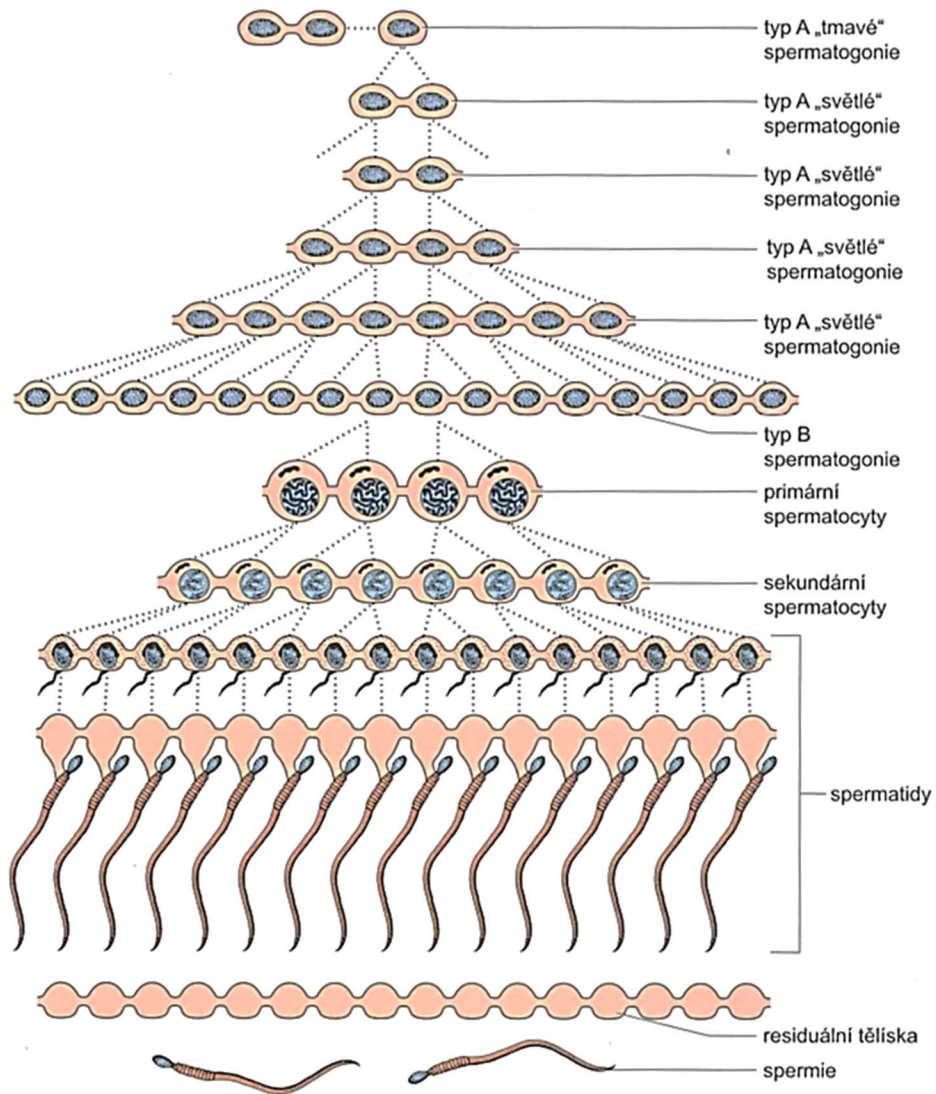
Tato fáze spermatogeneze se nazývá spermiogeneze. Spermatogeneze tedy probíhá ve 3 fázích:

1. fáze – mitotická, při níž probíhají postupně 4 mitotická dělení prepubertálních spermatogonií, tedy dochází k jejich proliferaci a obnovování za vzniku pre-leptotenních spermatocytů I (procesem spermatocytogeneze). Postupně tedy probíhá dělení tmavých spermatogonií A (dark) za vzniku světlých spermatogonií A (pale) a následně spermatogonií B, z nichž vznikne během čtyř mitotických dělení 16 spermatocytů. Všechny spermatogonie mají na rozdíl od spermatocytů kontakt s bazální membránou.

2. fáze – meiotická, která probíhá jako proces komplexní na úrovni molekul a chromozomů. Nejprve vznikají spermatocyty I s diploidní sadou chromozomů (po mitotické S-fázi u nich nastává meiotická profáze I trvající u člověka 24 dní) a poté z nich vyvíjí spermatocyty II s haploidní chromosomální sadou. Tedy z jednoho velkého spermatocytu I takto vzniknou dva menší spermatocyty II, které jsou pro svoji krátkou existenci zřídka zachyceny histologicky, jelikož po krátké interfázi přechází do druhé meiózy.

3. fáze – spermiogeneze, kdy dochází ke konečné složité diferenciaci malé spermatidy (kondenzace a modelace jádra, tvorba akrozomu s hydrolytickými enzymy a bičíku) za vzniku spermie, která je nakonec ze zárodečného epitelu uvolněna. Během spermiogeneze probíhá řízená náhrada histonů různými subtypy a protaminy s velkým podílem argininu a cysteinu. Dochází k tzv. spermiaci, při které dojde k přerušení membránových spojů mezi spermatidami a Sertoliho buňkami. (Trávník, 2018)

Celý proces vzniku zralé spermie z kmenové spermatogonie probíhá v rozmezí 72 až 91 dní. Spermatogeneze savců je jedním z nejsložitějších a nejzdlouhavějších diferenciačních procesů v biologii, který transformuje spermatogoniální kmenové buňky na vysoce specializované spermie po dobu několika týdnů. Tento komplikovaný proces diferenciace vyžaduje několik vývojově regulovaných mitochondriálních a metabolických přechodů, což z něj činí atraktivní modelový systém pro studium mitochondriální dynamiky *in vivo*. Mitochondriální fúze a štěpení (mitochondriální dynamika) jsou homeostatické procesy, které chrání normální buněčnou funkci. (Varuzhanyan, 2020)

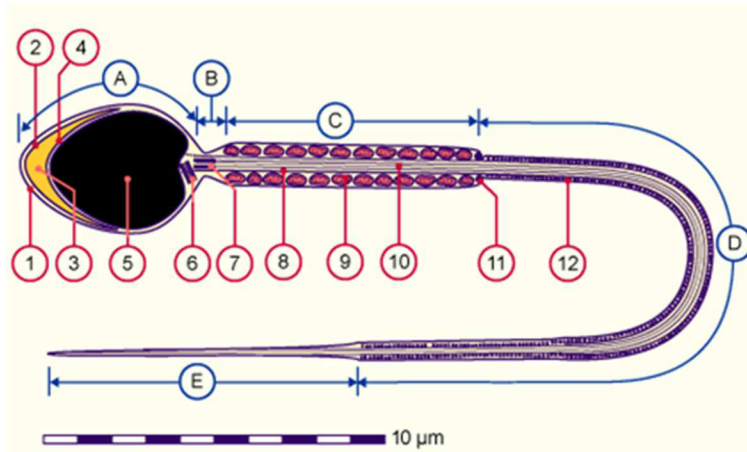


**Obrázek 1:** Schématické znázornění spermatogeneze

Zdroj: SADLER, Thomas W. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing as, 2011.

### 2.1.3 Stavba spermie

Spermie (obr. 2) je přibližně 60  $\mu\text{m}$  dlouhá vysoce diferencovaná buňka zcela pokrytá buněčnou membránou. Skládá se ze 3 částí: hlavičky, krčku a jako jediná lidská buňka i z bičíku.



**Obrázek 2:** Morfologie spermie

zdroj: Embryology.ch. Online. In: Www.embryology.ch. 2020. Dostupné z: [https://embryology.ch/old/images/cimggametogen/03spermato/c3i\\_spermium.gif](https://embryology.ch/old/images/cimggametogen/03spermato/c3i_spermium.gif). [cit. 2024-04-10].

**A** Hlavička, **B** Krček, **C** Střední oddíl, **D** Hlavní část bičíku, **E** Koncová část bičíku,  
**1** Plasmatická membrána, **2** Vnější akrozomální membrána, **3** Akrozom, **4** Vnitřní akrozomální membrána, **5** Jádru, **6** Proximální centrioly, **7** Distální centrioly, **8** Vnější fibrózní vlákna, **9** Mitochondrie, **10** Axonema, **11** Anulus (terminální disk),  
**12** Prstencová vlákna

#### 2.1.3.1 Hlavička

Fyziologicky má hlavička oválný oploštělý tvar. Její velikost je 2-3  $\mu\text{m}$  x 4-5  $\mu\text{m}$ . Tvoří ji jádro s velmi kondenzovaným chromatinem. Chromozomy jsou v jádře uspořádány tak, že centromery směřují dovnitř jádra a telomery jsou orientovány směrem k periférii. Jádru obklopuje cytoskeletová perinukleární theka. Krajiní dvě třetiny jádra pokrývá akrozom, který obsahuje řadu enzymů a glykoproteinů. Hlavička má tedy část akrozomální a postakrozomální. (Trávník, 2018)

### **2.1.3.2 Krček (střední část)**

Krček spojuje hlavičku a bičík. V prohlubni na jaderné bázi leží proximální centriol a pod ním se nachází distální centriol, ze kterého se formuje aparát pohybu spermie. Jsou to válcovité útvary složené z mikrotubulů. Podle posledních studií pravděpodobně mají oba tyto centrioly podíl na vzniku centrozomů zygoty a jsou prekurzory nových následujících generací centriolů zygoty a embrya. (Fishman et al, 2018)

### **2.1.3.3 Bičík**

Tuto část spermie tvoří axonema, kolem kterého jsou uspořádané hladké chordy a na nich mitochondriální pochva. Mitochondrie, které jsou šroubovitě uspořádané okolo hladkých chord, jsou zodpovědné za vznik energie potřebné k pohybu spermie. Délka bičíku se pohybuje okolo 55  $\mu\text{m}$  a jeho koncová část dlouhá 5  $\mu\text{m}$  obsahuje jen axonema. (Balko, 2017)

## **2.2 Patofyziologie spermatogeneze a spermií**

Spermatogeneze je proces složený z několika fází. V kterékoliv z nich může dojít ke vzniku chyby, která pak ovlivní kvalitu a schopnost vzniklé spermie. Jednou z příčin může být genetický faktor uplatňující se ve fázi pretestikulární (endokrinní příčiny), testikulární (nejčastěji poruchy meiózy) nebo posttestikulární (porucha transportu spermií díky obstrukci nebo problému s ejakulací). Zásadní vliv na spermatogenezi má numerická chromozomová vada u Klinefelterova syndromu. Nejčastější karyotyp je v tomto případě u mužů 47, XXY. Výrazné snížení plodnosti je také u osob s Downovým syndromem (47, XY, +21). U reciprokých translokací týkajících se pohlavních chromozomů je porucha plodnosti pravděpodobná nejvíce. (Trávník, 2018)

Významný vliv na spermatogenezi mají poruchy sekrece androgenů. Příčin může být celá řada, například poškození hypotalamu (z důvodu výskytu tumoru, poruchy prokrvení, ozařování nebo již zmíněných genetických defektů), hypofýzy (traumatem, autoimunitním onemocněním, infarktem, tumorem či hyperplazií), fyzická a psychická zátěž nebo enzymatické defekty v syntéze hormonů. (Nečas, 2021)

### **2.2.1 Abnormality spermií**

V případě kvalitativních změn se může abnormalita týkat hlavičky spermie, kdy rozeznáváme makrozoospermii (nález spermií se zvětšenou hlavičkou), globozoospermii (spermie s kulatou hlavičkou bez akrozomu) nebo nález acefalických spermií (tzv. špendlíkové hlavičky). U abnormalit bičíku je snížena pohyblivost spermie (asthenozoospermie) nebo současně i nález morfologicky změněného pohybového aparátu spermie (asthenoteratozoospermie), kdy je znemožněna progresivní motilita nezbytná k přirozenému oplození. Při změnách kvantity je pak důsledkem oligozoospermie, v krajním případě až azoospermie. (Trávník, 2018)

### **2.3 Spermioqram**

Analýza ejakulátu hraje klíčovou roli v diagnostice mužské infertility. Stanovení se provádí podle kritérií a postupů doporučených Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organization, dále jen WHO). Standardní vyšetření spermioqramu zahrnuje koncentraci, motilitu, morfologii a vitalitu spermií. (Gottardo, 2011)

#### **2.3.1 Normozoospermie**

Normální spermioqram musí splňovat všechna kritéria v rozmezích normálních hodnot, jak je uvedeno ve WHO manuálu, verze č. 6 z roku 2021 (tab. 1), a to objem: minimálně 1,5 ml, koncentrace minimálně 16 mil/ml, barva šedě opaleskující či mléčně zakalená, kapalnění maximálně do 60 minut od odevzdání, bez aglutinací a příměsí kulatých buněk, pH od 7,2 výše, motilita minimálně 40 % - z toho progresivní nad 32 %, morfologie minimálně 4 % normálních spermií. (WHO, 2021)

**Tabulka 1:** Hodnoty spermiogramu dle standardů WHO 2021

Parametry	Fyziologické hodnoty SPG
Barva	opaleskující
Objem	> 1,5ml
Morfologie	≥ 4 % normálních morfologie
Aglutinace (0 až 4)	0 až 1
Koncentrace spermií	≥ 16 x 10 <sup>6</sup> / ml
Celková motilita	≥ 40 %
PR motilita	≥ 32 %
pH	7,2
Leukocyty	<1 x 10 <sup>6</sup> / ml

Zdroj: WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization, 2021.

### 2.3.2 *Abnormality spermiogramu*

Jakákoliv odchylka spermiogramu od normálu je přesně definována (tab. 2). Týká-li se ejakulátu, používáme příponu – spermie, například Aspermie (nepřítomnost ejakulátu), Leukospermie (přítomnost leukocytů větší než 5 mil/ml) a Hematospermie (přítomnost erytrocytů). (WHO, 2021)

V případě, že je patologie vztažena ke kvalitě spermií, je přípona – zoospermie. Například Asthenozoospermie (snížená pohyblivost), Oligozoospermie (snížený počet spermií), Azoospermie (není přítomna žádná spermie), Kryptozoospermie (spermie jsou nalezeny až po centrifugaci) nebo Teratozoospermie (snížený podíl morfologicky normálních spermií). Při výskytu více abnormalit najednou, je název složen z výše uvedených, například Asthenoteratozoospermie, kdy vzorek nespĺňuje kritéria motility a morfologie. (WHO, 2021)



**Tabulka 2:** Terminologie spermiogramu

Označení	Popis
Normozoospermie	Vzorek splňující veškerá kritéria hodnocení
Asthenozoospermie	Motilita spermií: PR $\leq$ 22 %
Mírná asthenozoospermie	Motilita spermií: PR 23–31 %
Asthenoteratozoospermie	Vzorek nesplňuje kritéria motility a morfologie
Oligozoospermie	Koncentrace spermií: <16 mil/ml
Oligoasthenozoospermie	Vzorek nesplňuje kritéria koncentrace a motility
Oligoteratozoospermie	Vzorek nesplňuje kritéria koncentrace a morfologie
Teratozoospermie	<4 % spermií s normální morfologií
Oligoasthenoteratozoospermie	Vzorek nesplňuje kritéria koncentrace, motility i morfologie
Kryptozoospermie	Spermie jsou nalezeny až po centrifugaci
Azoospermie	Nepřítomnost spermií v ejakulátu
Aspermie	Nepřítomnost ejakulátu
Pyospermie / Leukospermie	Přítomnost >3 mil/ml leukocytů v ejakulátu
Hematospermie	Přítomnost erytrocytů v ejakulátu
Nekrozoospermie	Nepřítomnost motilních spermií v ejakulátu

Zdroj: WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization, 2021.

#### 2.4 Fyziologie procesu fertilizace a časného embryonálního vývoje

Fertilizace je proces, při kterém dochází ke spojení oocytu a spermie za vzniku zygoty. Při oplození *in vivo* musí být splněno několik nezbytných podmínek. U spermie je nutné, aby byla schopna progresivního pohybu, kapacity a v neposlední řadě také akrozomální reakce. Důležitá je přítomnost receptorů a faktorů, které aktivují oocyt. Spermie musí mít funkční proximální centriol a také haploidní sadu chromozomů. V případě oocytu je nezbytné, aby bylo ukončeno první meiotické dělení a aby měl oocyt v metafázi druhého meiotického dělení také haploidní chromozomální sadu, zralé struktury cytoplazmy, *zona pellucida* a funkční receptory pro spermii. (Trávník, 2018)

Současné studie se zabývají úlohou lidského spermatu pro vývoj časného embrya komplexně a jejich cílem je poskytnout lepší pochopení vlivu seminální plazmy a spermií na časné embryonální dělení, genovou a proteinovou expresi, potrat a vrozené nemoci. Zkoumají vliv seminální plazmy, otcovského centriolu, RNA, proteinů a integrity DNA a výsledná data naznačují, že mužské faktory přispívají k časnému vývoji embrya mnohem více než jen haploidním genomem. (Vallet-Buisan, 2023)

Schopnost oplodnit oocyt spermie získává *in vivo* během cesty ženským pohlavním traktem. Tento časově závislý proces, známý jako kapacitace, zahrnuje řadu strukturálních a fyziologických změn, včetně ztráty cholesterolu, reorganizace glykokonjugátů a fosforylace proteinů. Kapacitace spermií je spojená s jejich hyperaktivací, během které dochází ke změně charakteru pohybu. To pomůže spermii proniknout komplexem *cumulus-oophorus* (COC) obklopující oocyt. Výsledkem kapacitace je spermie schopná vázat se na *zona pellucida* a podstoupit akrozomální reakci. Tato vysoce regulovaná událost představuje kaskádu enzymatických reakcí, během kterých dochází ke zvýšení počtu kalciových iontů a aktivaci enzymu fosfokinázy C. Vrcholem akrozomální reakce je uvolnění obsahu akrozomu a odhalení vnitřní akrozomální membrány, jejíž proteiny a enzymy umožňují spermii proniknout do *zona pellucida* a vázat se s oocytem. Všechny tyto procesy jsou nezbytné pro dosažení úspěšného oplození. (Gómez-Torres, 2023)

Pro fúzi spermie a oocytu je důležitý akrozomální transmembránový protein IZUMO1, jehož přítomnost je na membráně spermií pro tento proces *in vivo* nezbytná. Může být také použit jako marker akrozomové reakce. Krok fúze je možné obejít *in vitro* metodou intracytoplasmatické injekce spermie do vajíčka, a tak může dojít k oplození i v případě deficitu tohoto proteinu. (Siu, 2021)

Na základě působení cytoplasmatické fosfolipázy C, která se nachází ve spermii, dochází k aktivaci oocytu, a to díky změně v koncentraci iontů kalcia. Po proniknutí spermie do vajíčka v metafázi II (MII – obr. 3) dojde k oddělení bičíku, proximálního centriolu, hlavičky a paternální mitochondrie jsou okamžitě fagocytovány. Jako časný embryonální vývoj je označováno období od oplození do implantace. Důkazem správné fertilizace jsou 2 prvojádra v cytoplazmě oocytu (mužské transformované z hlavičky spermie a ženské) a 2 pólová tělíska pod *zona pellucida* (Obr. 4). Zygota dědí paternálně centrozom, který

působí jako centrum MTOC (mikrotubulorganizující) a zároveň usnadňuje sestavení mitotického vřetena, segregaci chromozomů a dělení zygoty. Ovlivňuje i další aspekty organizace cytoskeletu v raném stádiu embrya. (Řezáčová et al., 2018; Xie, 2023)



**Obrázek 3:** Oocyt MII

Zdroj: vlastní



**Obrázek 4:** Fertilizovaný oocyt – 2PN

Zdroj: vlastní

Před zahájením prvního rýhování dojde k vymizení obalů obou prvojader, k formování chromozomů a ke spárování homologních chromozomů (*syngamie*). Následně se embryo mitoticky dělí na dvou, čtyř a osmibuněčné (obr. 5, 6 a 7). Tato dělení nejsou zcela synchronní, a tak můžeme v určitém okamžiku zaznamenat lichý počet blastomer. Dále následuje děj označovaný jako kompaktace, jehož výsledkem je stádium kompaktní moruly. V tomto stádiu již není možné rozlišit přesný počet buněk (obr. 8). Dalším vývojem se v morule tvoří dutinka, a nakonec se embryo diferencuje do stádia blastocysty s rozlišitelným trofoblastem (TE) a embryoblastem (ICM). Vzniká dutinka, která se postupně zvětšuje přes stádium časně blastocysty (obr. 9), plně blastocysty (obr. 10) až po plně expandovanou blastocystu (obr. 11) a hatchující blastocystu (obr. 12) díky nárůstu koncentrace iontů sodíku. (Gardner, 2013)



**Obrázek 5:** Dvoubuněčné embryo

Zdroj: vlastní



**Obrázek 6:** Čtyřbuněčné embryo

Zdroj: vlastní



**Obrázek 7:** Osmibuněčné embryo

Zdroj: vlastní



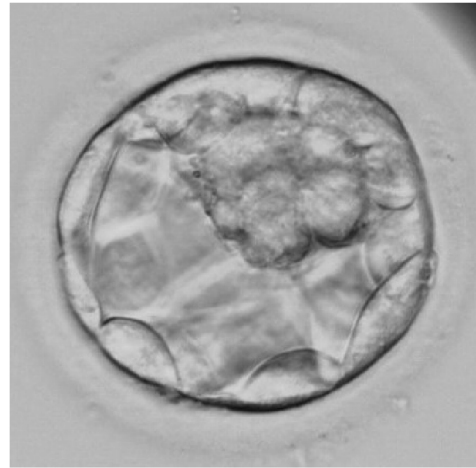
**Obrázek 8:** Kompaktní morula

Zdroj: vlastní



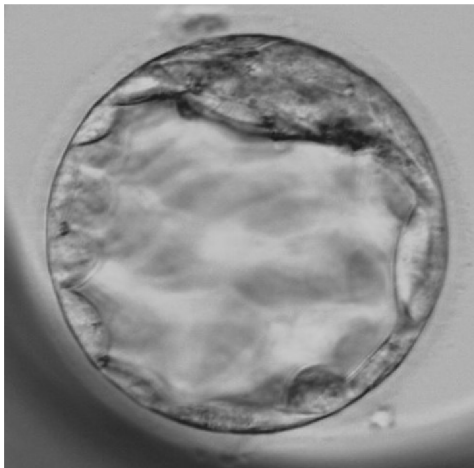
**Obrázek 9:** Časná blastocysta

Zdroj: vlastní



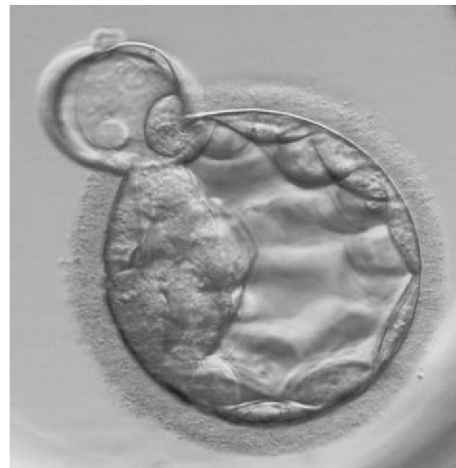
**Obrázek 10:** Plná blastocysta

Zdroj: vlastní



**Obrázek 11:** Plně expandovaná blastocysta

Zdroj: vlastní



**Obrázek 12:** Hatchující blastocysta

Zdroj: vlastní

Tento proces je uskutečňován prostřednictvím sodíkové pumpy, která se nachází v membráně buněk trofoblastu. Mezi těmito buňkami jsou těsné spoje, a to následně vede k rozpínání blastocysty. V případě, že dojde k narušení této těsnosti, blastocysta kolabuje. Díky reparačním procesům dochází k opětovné expanzi. Tento proces můžeme pozorovat opakovaně. V případě, že tlak tekutiny v dutině blastocysty překročí určitou mez, dojde k ruptuře *zona pellucida* a blastocysta ji začne postupně opouštět (klubat se neboli hatchovat). Vývoj lidského embrya od stadia zygoty do stadia blastocysty trvá přibližně 120 hodin. (Řezáčová et al., 2018)

*In vivo* probíhá vývoj embrya až do stádia 4 buněk ve vejcovodu. Třetí den vstupuje do dělohy jako osmibuněčné a již zde zůstává. V tomto období je u embrya aktivován lidský genom. Pohlaví vzniklé zygoty je dáno tím, jaký pohlavní chromozom přináší spermie, zda X nebo Y. Oocyt přispívá zygotě vždy chromozomem X. (Řezáčová et al., 2018)

## **2.5 Techniky separace spermií v asistované reprodukci**

### **2.5.1 Hodnocení spermogramu**

Před vlastním zpracováním ejakulátu se vždy provádí analýza jeho základních parametrů, zejména objem, konzistence, vzhled, koncentrace, motilita a morfologie dle WHO manuálu. Koncentrace se hodnotí pomocí hemocytometru (Bürker, Neubauer a Thoma), analyzátoru (CASA – počítačová analýza spermatu) nebo v Maklerově komůrce. Výsledná koncentrace se uvádí v 1 ml ejakulátu. Při hodnocení motility se rozlišuje podíl pohyblivých a progresivně pohyblivých spermií. Morfologie se stanovuje z barveného preparátu (imerzní objektiv, zvětšení 600x až 1500x) nebo pomocí IMSI objektivu při zvětšení až 6000x. (Trávník, 2022)

### **2.5.2 Centrifugační techniky**

Cílem těchto technik je separovat spermie od ostatních součástí ejakulátu za pomoci centrifugace a získat tak co nejkvalitnější spermie pro další metody asistované reprodukce. Zpracování spermií se provádí prostou nebo gradientovou centrifugací. (Trávník, 2022)

#### **2.5.2.1 Prostá centrifugace**

Tato metoda umožní centrifugací ejakulátu oddělit seminální plasmu od ostatních komponent, ale nevede k separaci spermií od buněk přítomných v ejakulátu ani k odstranění nekvalitních spermií. (Trávník, 2022)

#### **2.5.2.2 Gradientová centrifugace**

Touto metodou dojde při centrifugaci ejakulátu navrstveného na dvou nebo třístupňový gradient o různé koncentraci (například 90 %, 70 % a 50 %) k oddělení spermií od ostatních buněk, bakterií a některých virů, které ve vzorku mohou být přítomny. (Cissen et al, 1996)

### **2.5.3 *Techniky separace založené na aktivním pohybu***

Principem těchto technik je aktivní pohyb spermií, který od sebe oddělí spermie motilní a imotilní a v určité spojitosti s tím i morfologicky nekvalitní a kvalitní. Pro lepší výsledky je vhodné tyto metody kombinovat s centrifugačními. (Trávník, 2018)

#### **2.5.3.1 *Swim up***

Tato příprava spermií se může provádět dvěma způsoby. Prvním je swim up primární, při které se ejakulát převrství promývacím médiem, do kterého následně spermie vycestují. Druhým je swim up sekundární, kdy se promývacím médiem převrství materiál získaný po centrifugaci, a to prosté nebo gradientové. (Gardner, 2012)

### **2.5.4 *Techniky založené na průchodu speciálním prostředím***

V tomto případě prochází spermie přes speciálně upravenou komůrkou nebo přes membránu a dochází tak k jejich selekci metodami imitujícími některé procesy přirozeného výběru, které probíhají v ženském reprodukčním traktu. Na základě velikosti, pohyblivosti a dalších vlastností spermií dochází k získání co nejkvalitnější spermie metodou mikrofluidního čipu. (Nosrati, 2017, Vaughan, 2019)

### **2.5.5 *Techniky cílené separace spermií***

Nejpoužívanější metodou tohoto typu je MACS (magnetická separace spermií), která je založena vazbě apoptických spermií na magnetické částice s navázaným annexinem V. K oplození *in vitro* jsou následně použity neapoptické spermie, které volně prošly kolonou. (Gil et al, 2013)

## **2.6 *Metody asistované reprodukce***

Asistovaná reprodukce (dále jen AR) zahrnuje metody oplození *in vitro*, jejichž cílem je získání embrya schopného implantace a dalšího vývoje vedoucího k narození zdravého jedince. Mezi metody, které provádějí centra asistované reprodukce patří intrauterinní inseminace, klasická *in vitro* fertilizace (dále jen IVF) bez mikromanipulace a metody, které využívají mikromanipulační techniky, a to intracytoplazmatická injekce spermie (dále jen ICSI), intracytoplazmatická injekce morfologicky selektované spermie (dále jen IMSI) a intracytoplazmatická injekce preselektované spermie (dále jen PICSI). Klasické

IVF a mikromanipulačním technikám předchází hormonální stimulace pacientky a následná ovariální punkce oocytů. (Trávník, 2022)

### **2.6.1 Intrauterinní inseminace**

Intrauterinní inseminace (IUI) je jedním ze základních a nejjednodušších postupů při léčbě neplodnosti. Zahrnuje zpracování ejakulátu gradientovou nebo čipovou metodou, kdy dochází k získání co nejvíce kvalitních spermií z daného materiálu. Následně je vzorek zaveden inseminačním katetrem do dělohy ženy. (Trávník, 2022)

### **2.6.2 Klasická IVF**

Tato metoda se nejvíce přibližuje přirozenému oplození, ale její efektivita je podstatně nižší, než je tomu u postupů zahrnujících mikromanipulace. Při klasické IVF dochází ke spontánnímu oplození oocytů kapacitovanými suspendovanými spermiemi ve fertilizačním médiu. Základními předpoklady úspěšnosti této konvenční metody je použití spermií s progresivní motilitou a výběr vhodného fertilizačního média. (Trávník, 2022)

### **2.6.3 ICSI**

Nejčastější technikou asistované reprodukce je Intracytolazmatická injekce spermie do oocytu (ICSI) (obr. 13). Tato metoda umožňuje vyšší úspěšnost fertilizace i v případě snížené motility nebo počtu spermií a umožňuje oplození oocytů spermiemi získanými chirurgicky. Provedení ICSI vyžaduje manuální zručnost a mikromanipulační inverzní mikroskop. Oocyty je nutné pro tuto metodu očistit (denudovat) od kumulárních buněk. Pro oplození jsou použity pouze oocyty v metafázi II. Vybraná imobilizovaná spermie je mikromanipulační ICSI pipetou vpravena do oocytu, který je během injekce zafixován holding pipetou. (Trávník, 2022)





**Obrázek 13: ICSI**

Zdroj: vlastní

#### **2.6.4 IMSI**

Intracytoplazmatická injekce morfologicky selektované spermie je modifikací ICSI za použití speciálního IMSI objektivu. Je to další ze způsobů, jak vybrat co nejvíce morfologicky kvalitní spermii pro oplození, a to pod velkým zvětšením. (Vanderzwalmen, 2023)

#### **2.6.5 PICS**

Intracytoplazmatická injekce preselektované spermie je metoda, při které jsou spermie před provedením ICSI selektovány na základě jejich schopnosti se vázat na hyaluronan. Je to vlastnost spermie související zejména s její zralostí. Proto je PICS používána jako pokročilá technika výběru spermie k oplození oocyty. Srovnáním PICS a ICSI se zabývá například rozsáhlá studie HABSelect – Hyaluronic Acid Binding Sperm selection. (Martin, 2021)

### **2.7 Kultivace embryí**

Předpokladem zisku kvalitního embrya je vhodně zvolená kultivace, jejímž cílem je zisk embrya, které je schopné implantace a vede k porodu zdravého dítěte.

### **2.7.1 Délka kultivace**

Podle délky se rozlišuje krátkodobá nebo dlouhodobá kultivace, tzv. prodloužená. Při krátkodobé kultivaci se embrya kultivují dva nebo tři dny. Transferují se tedy ve stádiu čtyř až osmi buněk, což je nevýhodné z hlediska výběru embrya vhodného k transferu a k následné kryokonzervaci zbylých embryí, neboť v tomto stádiu se ještě plně neprojeví aktivace embryonálního genomu. Známkou této aktivace se schopnost embrya komprimovat. Nejlepším kritériem selekce je prodloužená kultivace do stádia blastocysty. Kromě možnosti lepšího výběru nejkvalitnějších embryí přináší tato metoda kultivace i další výhody. V tomto stádiu se embrya dobře vitrifikují a lze také provést biopsii trofoektodermu pro preimplantační genetické testování. (Trávník, 2022)

### **2.7.2 Kultivační médium**

Velmi důležitá je volba vhodného kultivačního média, které musí respektovat potřeby embrya. Tyto vodné roztoky obsahují mnoho anorganických a organických látek se specifickými metabolickými funkcemi. Tyto látky zajišťují vhodné pH, osmolaritu a oxidačně redukční vlastnosti média. Vzhledem k tomu, že jakákoliv manipulace s embryi mimo inkubátor může mít vliv na změnu koncentrace plynů a teploty, stále více se upřednostňuje použití jednokrokového média (one-step) před sekvenčními, která vyžadují provedení více úkonů. (Trávník, 2022)

### **2.7.3 Kultivační systémy**

Kultivační systémy tvoří komory inkubátoru a přídatná zařízení. Zajišťují optimální podmínky pro kultivaci embryí. Teplota, koncentrace plynů a vlhkost musí být udržovány v mezích vhodných pro vývoj embryí. Inkubátory jsou orientovány vertikálně (komorové) nebo horizontálně (s oddělenými komůrkami). Kultivační podmínky jsou v obou případech nepřetržitě monitorovány a udržovány. V současné době stále více center AR používá ke kultivaci embryí horizontální inkubátory s tzv. time-lapse monitoringem, kdy je vývoj embryí nepřetržitě zaznamenáván kamerovým systémem bez nutnosti s embryi, jakkoliv manipulovat. Výhodou je, že podmínky kultivace jsou v tomto případě velmi stabilní a díky možnosti kontinuálního sledování vývoje lze podle toho vybrat nejperspektivnější embryo k embryotransferu. (Gardner, 2012, Kovacs, 2014)

#### 2.7.4 Transfer embrya – embryotransfer

Embryotransfer (ET, obr. 14) je ambulantní výkon, během kterého lékař ve spolupráci s embryologem šetrně zavede embryo do děložní dutiny. Provádí se pomocí transferového katetru, který je zaveden do dutiny děložním hrdlem. Tento proces navazuje na kultivaci embryí a je jím zakončen cyklus *in vitro* fertilizace. Ve většině případů se embryo transferuje pátý den kultivace. (Chmel, 2020)



**Obrázek 14:** Embryotransfer

Zdroj: Single embryo transfer (SET). Online. In: Invitra. Dostupné z: <https://www.invitra.com/en/embryo-transfer-in-spain/web/>. [cit. 2024-04-10].

### **3 Praktická část**

Pro tuto práci byly použity spermie, oocyty a embrya v rámci IVF programu v našem centru asistované reprodukce. Do praktické části této práce jsme zařadili metodu pro separaci spermií mikrofluidním chipem ZyMot a hustotní gradientovou centrifugací a metody invazivního oplození oocytů ICSI a IMSI.

#### ***3.1 Metoda přípravy spermií pomocí mikrofluidního chipu ZyMot***

V oblasti asistované reprodukce je mechanismus přirozeného výběru spermií napodoben v laboratorním prostředí díky použití mikrofluidního chipu (Obr. 15), který využívá schopnosti zdravých a kvalitních spermií procházet membránou s mikrokánálky o průměru 8  $\mu\text{m}$ . Zároveň tato metoda minimalizuje aditivní tvorbu volných radikálů dlouhou centrifugací, jak zmiňuje výrobce.

##### ***3.1.1 Použité materiálové a přístrojové pomůcky***

sterilní odběrový kelímek, mikrofluidní chip ZyMot, sterilní centrifugační zkumavka, tuberkulinky, Pasteurovy pipety,

Sperm wash

laminární box HERAGuard ECO, Inkubátor Labotect C42, mikroskop Olympus CX41

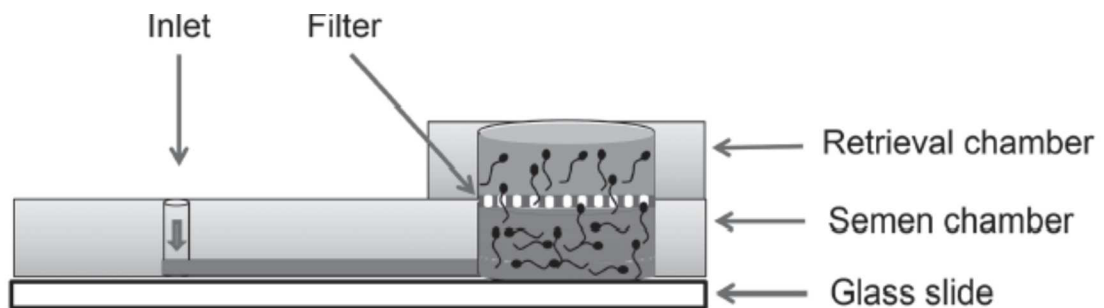
##### ***3.1.2 Vlastní provedení***

- Do příslušného otvoru předem označeného mikrofluidního chipu ZyMot se injekční stříkačkou pomalu vypustí přesný objem ejakulátu.
- Do druhého určeného otvoru se vypustí přesný objem wash media.
- Během 30min inkubace v termostatu dojde k průchodu nejkvalitnějších spermií přes speciální membránu z ejakulátu do wash média (obr. 16).
- Médium se spermiemi je následně odsáto do předem označené zkumavky. Takto je vzorek připraven k použití pro oplození.



**Obrázek 15:** ZyMot mikrofluidní chip

Zdroj: vlastní



**Obrázek 16:** ZyMot mikrofluidní chip

Zdroj: Propagační materiál firmy ZyMot Fertility

### 3.2 *Metoda přípravy spermií gradientovou centrifugací*

#### 3.2.1 *Použité materiálové a přístrojové pomůcky*

sterilní odběrový kelímek, sterilní centrifugační zkumavka, tuberkulinka, Petriho misky, Pasteurovy pipety

Sperm wash, Gradient 100

laminární box HERAGuard ECO, Inkubátor Labotect C42, mikroskop Olympus CX41

### 3.2.2 *Vlastní provedení*

- Pro tuto metodu je do inkubátoru při 37 °C předem připravena konická centrifugační zkumavka s postupně navrstveným hustotním gradientem (1,5 ml 90% + 0,3 ml 70% + 0,3 ml 50% roztoku Gradient 100).
- Pomocí sterilní plastové Pasteurovy pipety se ejakulát opatrně navrství na hustotní gradient ve zkumavce předem označené štítkem se jmény a daty narození obou partnerů.
- Uzavřená zkumavka se centrifuguje při 2000 otáčkách po dobu 20 minut.
- Následně se sterilní Pasteurovou pipetou odsaje supernatant a peleta se resuspenduje v 8 ml wash média.
- Uzavřená zkumavka se centrifuguje při 2000 otáčkách po dobu 8 minut.
- Poté se supernatant odstraní a spermie z pelety, která zůstane v konické části zkumavky se použijí pro oplození.

### 3.3 *Metody invazivního oplození in vitro*

Díky metodám intracytoplasmatické injekce spermie (ICSI) a intracytoplasmatické injekce morfologicky selektované spermie (IMSI) je možné řešit prakticky každý typ mužské neplodnosti v případě, že se podaří získat spermie. Principem obou těchto metod je injekce jedné vybrané spermie přímo do oocyty. V případě IMSI se výběr spermie provádí pomocí IMSI objektivu. (De Vos et al, 2013)

#### 3.3.1 *Použité materiálové a přístrojové pomůcky*

sterilní odběrový kelímek, mikrofluidní chip ZyMot, sterilní centrifugační zkumavka, tuberkulinka, Petriho misky, kultivační miska 4well dish, kultivační miska 5well dish, kultivační miska CultureCoin, sterilní špičky, automatické pipety, ICSI misky, flexi pipety, ICSI pipeta, Holding pipeta, Pasteurovy pipety

Sperm wash, Gradient 100, médium Global total LP for fertilization, Cumulase, PVP, médium Global total LP HEPES, kultivační médium Global total LP, minerální olej

laminární boxy, inkubátor Labotect C42, mikroskop Olympus CX41, stereomikroskop Leica, mikroskop Leica, ICSI mikroskop Olympus IX 70 s mikromanipulátory a injektory Eppendorf, Inkubátor ESCO MIRI TL12

### **3.3.2 Vlastní provedení**

- Pomocí automatických pipet je předem připravena mikromanipulační ICSI miska.
- Do ní jsou následně přeneseny do příslušného proužku média připravené spermie a do kapek denudované oocyty.
- Miska je následně umístěna na vyhřívaný stolek ICSI mikroskopu.
- Za pomoci mikromanipulátorů je proveden výběr a imobilizace vhodné vybrané spermie a její nasátí do ICSI pipety.
- Pomocí Holding pipety je oocyt zafixován ve stabilní poloze.
- ICSI pipeta se spermií je svým hrotem opřena o ZP oocytu a spermie je posunuta co nejbližší oocytu.
- ICSI pipeta je jemným tlakem zavedena do cytoplazmy oocytu.
- Kontrolovaně je cytoplasma zpětným chodem aspirována, až dojde k prasknutí oolemy.
- Následně je cytoplasma spolu se spermií injikována do oocytu.
- Tímto způsobem se injikují všechny zralé oocyty dané pacientky.

### **3.4 Hodnocené parametry**

Pro zhodnocení vlivu mikrofluidní separace spermií na úspěch IVF terapie jsme zvolili základní embryologické a klinické ukazatele úspěšnosti, které doporučuje evropská společnost pro lidskou reprodukční embryologii – ESHRE ve svém doporučení z roku 2017.

1. Fertilization rate (FR), fertilizační poměr, vyjadřuje podíl mezi fyziologicky fertilizovanými oocyty a oocyty určenými k fertilizaci;

$$\text{Výpočet: FR [\%]} = \frac{n_{2PN}}{n_{MII}} \times 100$$

2. Blastocyst rate (BR), poměr blastocyst, je parametr, který vyjadřuje zisk blastocyst po 120 hodinách kultivace ze všech fertilizovaných oocytů (2PN);

$$\text{Výpočet: BR [\%]} = \frac{n_{\text{blastocyst d5}}}{n_{2PN}} \times 100$$

3. Jako úspěch celé IVF léčby lze hodnotit zachycení srdeční akce embrya při ultrazvukovém vyšetření, které probíhá obvykle za 14 dní po provedení embryotransferu. Tento stav popisuje parametr Implantation rate (IR);

$$\text{Výpočet: IR [\%]} = \frac{n_{\text{gestačních váček se srdeční akcí}}}{n_{\text{provedených embryotransferů}}} \times 100$$

### **3.5 Popis statistických metod**

Zhodnocení a analýzu získaných dat za období leden 2023 až únor 2024 jsme provedli v programu MS excel 2011 a vyhodnotili Fisherovým exaktním testem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrný rozdíl a hodnota statistické signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ .



## 4 Výsledky

Sledovaný soubor srovnávací retrospektivní studie zahrnoval 129 léčených párů, které v centru asistované reprodukce Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o. podstoupili léčbu neplodnosti ICSI/IMSI metodou s využitím darovaných oocytů a následným embryotransferem.

Do studie byli zařazeni muži, od kterých jsme měli v den odběru oocytů čerstvý ejakulát. Další selekční mechanismus spočíval v analýze ICSI/IMSI cyklů, ve kterých byly použity darované oocyty z důvodu co nejvyšší eliminace ženského faktoru neplodnosti. Výsledkem této selekce bylo možné sledovat vliv mikrofluidní separace spermií na výsledek IVF léčby.

Celý soubor (viz přílohy) byl rozdělen na 2 skupiny, podle metody, která byla zvolena pro přípravu spermií k fertilizaci oocytů. Analyzovanou skupinu tvořilo 69 mužů, jejichž spermie byly separovány pomocí mikrofluidního chipu ZyMot. Referenční skupina zahrnovala 60 případů, kde byly spermie z ejakulátu získány gradientovou centrifugací (tab. 3).

**Tabulka 3:** Rozdělení hodnoceného souboru na skupiny

Název skupiny	Počet mužů	Zastoupení [%]
Referenční skupina	60	46,5
Analyzovaná skupina	69	53,5

**Tabulka 4:** Distribuce oocytů a zhodnocení výsledku fertilizace

FR [%]	n MII	n 2PN	% FR	<i>p</i>
Referenční skupina	579	482	83,2	0,8035
Analyzovaná skupina	723	589	81,5	
Rozdíl			1,8	

Referenční skupina zahrnovala celkem 579 oocytů ve stádiu MII, které byly fertilizovány spermii z ejakulátu hustotní gradientovou centrifugací. V této skupině došlo k oplození 482 oocytů. Fertilizační poměr v referenční skupině byl 83,2 %. 723 MII

oocytů bylo fertilizováno spermii, které byly separovány přes mikrofluidní chip, fertilizační poměr v této skupině byl 81,5 %. Rozdíl mezi referenční a analyzovanou skupinou byl 1,8 % a nedosahoval statistické významnosti ( $p = 0,8035$ ). Dle těchto dat je patrné, že zvolená separační technika nemá vliv na fertilizační schopnost spermií (tab. 4).

**Tabulka 5:** Zhodnocení vlivu separovaných spermií na zisk blastocyst

BR [%]	n 2PN	n BI po 120 hod.	% BR	<i>p</i>
Referenční skupina	482	256	53,1	<i>0,5031</i>
Analyzovaná skupina	589	336	57,0	
Rozdíl			3,9	

Vyšší počet blastocyst po 120 hodinách kultivace byl získán v analyzované skupině, bylo získáno 256 blastocyst ze 482 oplozených oocytů (BR = 57,0 %) oproti referenční skupině, kde byl BR = 53,1 % (geneze 336 blastocyst z 589 zygot). Rozdíl mezi oběma skupinami byl 3,9 % na hladině významnosti  $p = 0,5031$ . Tento rozdíl nedosáhl statistické signifikance (tab. 5).

**Tabulka 6:** Zhodnocení vlivu spermií na dosažení klinické gravidity

IR [%]	n poz. AS	n neg. AS	% IR	<i>p</i>
Referenční skupina	15	4	37,5	<i>0,6599</i>
Analyzovaná skupina	17	2	48,6	
Rozdíl			11,1	

V referenční skupině bylo provedeno 40 embryotransferů, během kterých byla přenesena pacientce vždy jen 1 blastocysta. V 15 případech došlo k implantaci embrya, u kterého byla detekována pozitivní srdeční akce, IR byl v této skupině 37,5 %. 35 embryotransferů podstoupily páry ze sledované skupiny. I v těchto případech byla k embryotransferu připravena pouze jedna blastocysta. U 17 párů došlo k zachycení embrya s pozitivní srdeční akcí výslední IR byl 48,6 %. Rozdíl v parametru IR byl 11,1 % ovšem na hladině statistické významnosti  $p = 0,6599$  (tab. 6).

## 5 Diskuse

Kvalita gamet rozhoduje ve velké míře o výsledku IVF léčby. Nicméně kvalitu spermioqramu jsme schopni ovlivnit velmi málo. Spermioqram je vyšetřován na základě konvenční analýzy parametrů ejakulátu. Toto vyšetření je velice variabilní, jak z hlediska získaných výsledků, tak způsobu provedení, a především toto vyšetření nezachycuje funkční poruchy spermií a už vůbec ne jejich příčinu.

V 90. letech minulého století došlo k celosvětovému rozšíření metody ICSI a jejích modifikací a zdálo se, že další selekční metody spermií již nejsou nutné. S postupem času se toto paradigma náhledu na vyšetření a použití spermií při léčbě neplodnosti změnilo. V posledních 10 letech dochází k rozvoji dalších funkčních testů spermií, přičemž nejdůležitějším testem je stanovení míry DNA fragmentace spermií. DNA fragmentace je nejčastější anomálií spermií a ovlivňuje fertilization rate, kvalitu vývoje preimplantačního embrya a tím pádem i celý výsledek IVF léčby. Z tohoto důvodu je současným trendem vývoj a zavádění specifických selekčních metod.

První z těchto metod je MACS, která je založena na principu selekce apoptických spermií v magnetickém poli. Tato metoda je používána v lidské reprodukci téměř 10 let a dle metaanalýzy z roku 2020 (Pacheco A., et al, 2020) zaznamenala vyšší nárůst klinických gravidit u IVF cyklů s použitím spermií po magnetické selekci.

Další rozšířenou a velice oblíbenou technikou ve světě je sperm sorting na mikrofluidním chipu. Cílem separace je získání populace hyperaktivních spermií, což je stejná populace spermií jako u metody swim up nebo hustotní gradientové centrifugace. Oproti klasické gradientové centrifugaci a metodě swim up má mikrofluidní separace spermií řadu výhod, jako je velká selekční plocha (systém kanálků a membrán z polymetylenmetakrylátu) a minimální manipulace se vzorkem ejakulátu. Díky tomu nedochází k aditivní produkci reaktivních kyslíkových radikálů, které mohou separované spermie poškozovat, právě díky jejich působení na integritu DNA. Nespornou výhodou techniky je přesné definování časového bodu k separaci hyperaktivní frakce spermií vhodných pro fertilizaci. Tato metoda tedy umožňuje separaci hyperaktivních spermií, které dle závěrů studie z roku 2020 (LEISINGER, Chelsey A., et al, 2020) nemají poškozenou integritu DNA oproti populaci spermií získaných separací před hustotní gradient. Tento závěr naše práce nepotvrzuje ani nevylučuje, protože toto téma nebylo jejím hlavním cílem. Selektce

spermií pomocí mikrofluidních chipů se v humánní reprodukci využívá v posledních 5 letech a recenzovaných prací na toto téma je velmi málo.

Cílem této práce bylo zjistit, zda selekce spermií pomocí mikrofluidních chipů ovlivňuje výsledek IVF léčby. Byla provedena retrospektivní analýza 129 IVF cyklů provedených v období od ledna 2023 do února 2024 na pracovišti Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o., kde u 69 pacientů proběhla selekce spermií pomocí mikrofluidního chipu (dále jen analyzovaná skupina) a u zbývajících 60 pacientů byly spermie pro fertilizaci získány centrifugací přes hustotní gradient (dále jen referenční skupina). V obou skupinách byly vzorky s normálními i abnormálními hodnotami vstupního spermioqramu.

Dárčovské oocyty byly oplozovány mikromanipulační technikou ICSI/IMSI a následná kultivace embryí probíhala 120 hodin v inkubátoru ECSO MIRI TL12. Tím, že došlo k použití oocytů od dárkyň se podařilo minimalizovat ovlivnění výsledků ženským faktorem neplodnosti.

Po provedení fertilizace oocytů byla v obou skupinách hodnocena její úspěšnost (analyzovaná skupina: 81,5 %, referenční skupina: 83,2 %), rozdíl mezi těmito skupinami nedosahuje statistické významnosti, pravděpodobně kvůli nízkému počtu hodnocených cyklů. Ovšem výsledky naší práce se téměř shodují s výsledky ze studie autorů LEISINGER, Chelsey A., et al, 2020, kde bylo dosaženo FR (analyzovaná skupina: 79,3 %, referenční skupina: 81,9 %). Rozdíl v tomto případě dosahoval statistické signifikace (606 hodnocených IVF cyklů).

Důležitým embryologickým parametrem byl zisk blastocyst v obou skupinách po 120 hodinách kultivace, BR v analyzované skupině byl 57,0 % a v referenční skupině 53,1 %, stejně jako u parametru FR nedosáhl rozdíl statistické signifikace opět díky nízkému počtu hodnocených cyklů. Výsledky dosahují prakticky stejných hodnot jako v publikaci autorů LEISINGER, Chelsey A., et al, 2020, kde BR byl (58,5 % v analyzované skupině a 50,6 % v referenční skupině). Výsledky potvrzují, že využití mikrofluidní separace spermií pozitivně ovlivňuje zisk blastocyst.

Klinický ukazatel úspěšnosti IVF léčby implantation rate (IR) dosáhl v analyzované skupině 48,6 % a v referenční skupině 37,5 %. Rozdíl mezi skupinami nedosáhl statistické významnosti, ovšem dosahované hodnoty jsou téměř shodné s prací

publikovanou v roce 2020 kolektivem autorů LEISINGER, Chelsey A., et al. V této práci došlo ke vzniku klinické gravidity v 50,0 % u párů, kde byl pro separaci spermií využit mikrofluidní chip. A 35,0 % klinických gravidit vzniklo ve skupině párů, kde byly spermie získány separací s využitím hustotní gradientové centrifugace.

V naší práci, se nám nepodařilo prokázat signifikantní rozdíl mezi páry u kterých byl využit k zisku spermií mikrofluidní chip a páry, kde byly spermie izolovány gradientovou centrifugací. Ovšem je patrné, že separace spermií přes mikrofluidní chipy pozitivně ovlivňuje výsledek IVF léčby, tím, že je dosaženo vyšší geneze blastocyst a tím může být zvýšena i šance na klinickou graviditu.

## 6 Závěr

Metody selekce spermií pomocí mikrofluidních chipů a gradientové centrifugace jsou z hlediska úspěchu klinických parametrů IVF léčby téměř srovnatelné a nepodařilo se prokázat signifikantní významnost, zda mikrofluidní separace spermií ovlivňuje úspěšnost IVF léčby, kterou jsme sledovali pomocí parametrů FR, BR a IR.

Ve skupině, kde byly spermie separovány pomocí mikrofluidních chipů bylo získáno vyšší množství blastocyst, které mohou být použity pro další léčbu. Lze předpokládat, že u těchto párů dojde k vyšší šanci na graviditu. V této skupině bylo dosaženo i vyššího počtu klinických gravidit.

Mikrofluidní separace spermií přes mikrofluidní chipy ovlivňuje pozitivně výsledky IVF léčby, je ovšem potřeba sledovat a analyzovat větší množství léčených párů.

## 7 Seznam použitých zdrojů

1. BALKO, Jan; TONAR, Zbyněk; VARGA, Ivan. *Memorix histologie*. Triton, 2017.
2. CISEN, Maartje, et al. Assisted reproductive technologies for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1996, 2016.2.
3. COTICCHIO, Giovanni, et al. Plasticity of the human preimplantation embryo: developmental dogmas, variations on themes and self-correction. *Human reproduction update*, 2021, 27.5: 848-865.
4. DE VOS, Anick, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a critical and evidence-based review. *Basic and Clinical Andrology*, 2013, 23: 1-8.
5. DOW, Katharine. 'The men who made the breakthrough': How the British press represented Patrick Steptoe and Robert Edwards in 1978. *Reproductive Biomedicine & Society Online*, 2017, 4: 59-67.
6. FISHMAN, Emily L., et al. A novel atypical sperm centriole is functional during human fertilization. *Nature communications*, 2018, 9.1: 2210.
7. GARDNER, David K., et al. (ed.). *Textbook of assisted reproductive techniques fourth edition: volume 2: Clinical perspectives*. CRC press, 2012.
8. GARDNER, David K.; WALE, Petra L. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertility and sterility*, 2013, 99.4: 1062-1072.
9. GIL, Monica, et al. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2013, 30: 479-485.
10. GÓMEZ-TORRES, María José, et al. IZUMO1 Receptor Localization during Hyaluronic Acid Selection in Human Spermatozoa. *Biomedicine*, 2023, 11.11: 2872.
11. GOTTARDO, F.; KLIESCH, S. Semen analysis: spermogram according to WHO 2010 criteria. *Der urologe*, 2011, 50: 101-108.

12. GRANDE, Giuseppe; FORESTA, Carlo. Male Reproduction: From Pathophysiology to Clinical Assessment. In: *Practical Clinical Andrology*. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 161-172.
13. CHMEL, Roman. Metody asistované reprodukce—aktuální stav a perspektivy. *Česká gynekologie*, 2020, 244-253.
14. KLIESCH, Sabine. " Practical spermogram"-semen analysis according to WHO recommendations. *Der Urologe. Aug. A*, 2021, 60.5: 647-656.
15. KOVACS, Peter. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12.1: 1-11.
16. LEISINGER, Chelsey A., et al. Effect of microfluidic sperm separation vs. standard sperm washing processes on laboratory outcomes and clinical pregnancy rates in an unselected patient population. *Reproductive Medicine*, 2021, 2.3: 125-130.
17. MARTIN, Catherine; WOODLAND, Emma. Sperm selection technology in ART. In: *Seminars in Reproductive Medicine*. 333 Seventh Avenue, 18th Floor, New York, NY 10001, USA: Thieme Medical Publishers, Inc., 2021. p. 200-206.
18. NEČAS, Emanuel, *Obecná patologická fyziologie*. Charles University in Prague, Karolinum Press, 2021.
19. NOSRATI, Reza, et al. Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nature Reviews Urology*, 2017, 14.12: 707-730.
20. OZCAN, Pinar, et al. Does the use of microfluidic sperm sorting for the sperm selection improve in vitro fertilization success rates in male factor infertility? *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2021, 47.1: 382-388.
21. PACHECO, Alberto, et al. Magnetic-activated cell sorting (MACS): a useful sperm-selection technique in cases of high levels of sperm DNA fragmentation. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9.12: 3976.
22. ŘEZÁČOVÁ, Jitka. *Reprodukční medicína: současné možnosti v asistované reprodukci*. Mladá fronta, 2018.
23. SIU, Karen K., et al. The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fuksino. *Journal of Cell Biology*, 2021, 220.10: e202102146.



24. STUHLÍKOVÁ, Michaela. Patologické změny spermatické morfologie. 2022.
25. TRÁVNÍK, Pavel, et al. *Základy obecné a speciální embryologie pro klinické embryology*. YBUX sro, 2011.
26. TRÁVNÍK, Pavel. *Klinická embryologie*. Mladá fronta, 2018.
27. TRÁVNÍK, Pavel, *Klinická fyziologie lidské reprodukce*. Grada Publishing as, 2022.
28. VALLET-BUISAN, Montserrat, et al. Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond. *Human Reproduction Update*, 2023, dmad006.
29. VANDERZWALMEN, Pierre; SCHUFF, Maximilian; WIRLEITNER, Barbara. Sperm Selection for ICSI by MorphologyMSOME/IMSI. *Principles of IVF Laboratory Practice: Laboratory Set-Up, Training and Daily Operation*, 2023, 186.
30. VARUZHANYAN, Grigor; CHAN, David C. Mitochondrial dynamics during spermatogenesis. *Journal of cell science*, 2020, 133.14: jcs235937.
31. VAUGHAN, Denis A.; SAKKAS, Denny. Sperm selection methods in the 21st century. *Biology of reproduction*, 2019, 101.6: 1076-1082.
32. VOKURKA, Martin. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. Charles University in Prague, Karolinum Press, 2019.
33. WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health Organization, 2021.
34. XIE, Philip, et al. Sperm centriolar factors and genetic defects that can predict pregnancy. *Fertility and Sterility*, 2023.

## 8 Seznam obrázků a příloh

<b>Obrázek 1:</b> Schématické znázornění spermatogeneze .....	12
<b>Obrázek 2:</b> Morfologie spermie .....	13
<b>Obrázek 3:</b> Oocyt MII .....	19
<b>Obrázek 4:</b> Fertilizovaný oocyt – 2PN .....	19
<b>Obrázek 5:</b> Dvoubuněčné embryo .....	20
<b>Obrázek 6:</b> Čtyřbuněčné embryo .....	20
<b>Obrázek 7:</b> Osmibuněčné embryo .....	20
<b>Obrázek 8:</b> Kompaktní morula .....	20
<b>Obrázek 9:</b> Časná blastocysta .....	21
<b>Obrázek 10:</b> Plná blastocysta .....	21
<b>Obrázek 11:</b> Plně expandovaná blastocysta .....	21
<b>Obrázek 12:</b> Hatchující blastocysta .....	21
<b>Obrázek 13:</b> ICSI .....	25
<b>Obrázek 14:</b> Embryotransfer .....	27
<b>Obrázek 15:</b> ZyMot mikrofluidní chip .....	29
<b>Obrázek 16:</b> ZyMot mikrofluidní chip .....	29
<b>Příloha 1:</b> Zdrojová data .....	45

## 9 Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Hodnoty spermogramu dle standardů WHO 2021 .....	16
<b>Tabulka 2:</b> Terminologie spermogramu .....	17
<b>Tabulka 3:</b> Rozdělení hodnoceného souboru na skupiny .....	33
<b>Tabulka 4:</b> Distribuce oocytů a zhodnocení výsledku fertilizace .....	33
<b>Tabulka 5:</b> Zhodnocení vlivu separovaných spermií na zisk blastocyst .....	34
<b>Tabulka 6:</b> Zhodnocení vlivu spermií na dosažení klinické gravidity .....	34

## 10 Seznam zkratek

AR	Asistovaná reprodukce
BI	Blastocysta
BR	Blastocyst rate, poměr blastocyst
COC	<i>Cumulus oophorus</i> , oocyt obklopený kumulárními buňkami
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ET	Embryotransfer
FR	Fertilization rate, fertilizační poměr
ICM	Intra cell mass, Embryoblast
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermie
IMSI	Intracytoplazmatická injekce morfologicky selektované spermie
IR	Implantation rate, implantační poměr
IUI	Intrauterinní inseminace
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
MACS	Magnetická separace spermií
MII	Metafáze II
MTOC	Mikrotubuloorganizující
PICSI	Intracytoplazmatická injekce preselektované spermie
RNA	Ribonukleová kyselina
TE	Trofoektoderm, Trofoblast
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace
ZP	<i>Zona pellucida</i> , glykoproteinový obal oocyту

