

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: B-MOBIBO



**Hana Jeřábková**

*Současné možnosti a perspektivy pokročilých buněčných terapií samičích pohlavních buněk a embryí*  
*Current approaches and perspectives of female germ cells and embryo therapies*

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Helena Fulková, Ph.D.

Praha, 2025

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Pro překlad textu z anglického do českého jazyka byla použita umělá inteligence. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.04.2025

Podpis Hana Jeřábková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce, Mgr. Heleně Fulkové, Ph.D., za její cenné rady a trpělivost, které mi pomohly při zpracování této bakalářské práce. Její podpora a vstřícný přístup pro mě byly velkou oporou. Své díky patří všem, kteří mě po celou dobu studia podporovali a dodávali mi sílu, bez jejich podpory by tato práce nevznikla.

## **ABSTRAKT**

Technika přenosu genetického materiálu mezi oocyty a zygotami představuje novou a slibnou cestu v oblasti reprodukční biomedicíny. Tyto metody by se mohly uplatnit při prevenci přenosu mitochondriálních chorob, léčby neplodnosti spojené se sníženou kvalitou oocytů a ve výzkumu raných stádií embryonálního vývoje. Přenos genetického materiálu lze provádět v různých vývojových stádiích, tato práce je zaměřena na přenos u nezralých oocytů (germinal vesicle transfer – GVT), zralých oocytů před oplození (spindle transfer – ST) a po oplození (pronuclear transfer – PNT). Tyto metody využívají techniky mikromanipulace a fúze membrán, které vyžadují precizní práci. Ačkoliv tyto metody dosud nejsou běžně využívány v rámci asistované reprodukce, dosavadní výzkumy prokázaly jejich značný potenciál. Pomocí těchto metod se například povedlo v jednom výzkumu přenést méně než 1 % mutované mitochondriální DNA a narodily se zdravé děti bez projevů mitochondriálních chorob. Velká Británie se v roce 2015 stala první zemí, která legalizovala použití metod přenosu dělicího vřeténka a prvojader k prevenci mitochondriálních chorob z matky na dítě.

**Klíčová slova:** oocyt, embryo, genetický materiál, přenos jader, buněčné terapie, mitochondriální DNA

## **ABSTRACT**

The transfer of genetic material between oocytes and zygotes represents a novel and promising avenue in reproductive biomedicine. This approach aims to prevent the transmission of mutated mitochondrial DNA, overcome infertility associated with reduced oocyte quality and to facilitate the study of early stages of embryonic development. Nuclear transfer can be performed at different developmental stages, the focus of this thesis is on transfer in immature oocytes (germinal vesicle transfer – GVT), mature oocytes before fertilization (spindle transfer – ST) and fertilized zygotes (pronuclear transfer – PNT). These methods involve micromanipulation and membrane fusion techniques that require high degree of precision. Although these methods are not yet applied in routine assisted reproduction, current research has demonstrated their considerable potential. For instance, less than 1 % of mutated mitochondrial DNA has been transferred using these methods, and healthy babies have been born with no evidence of mitochondrial disease. In 2015, the UK was the first country to legalize and regulate techniques of genetic material transfer such as spindle transfer (ST) and pronuclear transfer (PNT) for the prevention of mitochondrial disease transmission.

**Key words:** oocyte, embryo, genetic material, nuclear transfer, cell therapy, mitochondrial DNA

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AFC</b>	antral follicle count, počet antrálních folikulů
<b>AHM</b>	anti-Müllerian hormone, anti-Mullerianský hormon
<b>AMA</b>	advanced maternal age, pokročilý věk matky
<b>ART</b>	assisted reproductive technologies, asistovaná reprodukce
<b>ATP</b>	adenosine triphosphate, adenosintrifosfát
<b>BMP15</b>	bone morphogenetic protein 15
<b>BSA</b>	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
<b>DOR</b>	diminished ovarian reserve, snížená ovariální rezerva
<b>ePNT</b>	early pronuclear transfer, časný přenos prvojader
<b>FCS</b>	fetal calf serum, fetální telecí serum
<b>FMR</b>	fragile X mental retardation
<b>FMR1</b>	fragile X mental retardation 1
<b>FMR2</b>	fragile X mental retardation 2
<b>FMRP</b>	fragile X mental retardation protein
<b>FSH</b>	follicle-stimulating hormone, folikulostimulační hormon
<b>FSHR</b>	follicle-stimulation hormone receptor
<b>GDF9</b>	growth differentiation factor 19
<b>GV</b>	germinal vesicle, zárodečný váček
<b>GVBD</b>	germinal vesicle breakdown, rozpad jaderné membrány
<b>GVT</b>	germinal vesicle transfer, přenos zárodečného váčku
<b>hCG</b>	human chorionic gonadotropin, lidský choriový gonadotropin
<b>HJV-E</b>	hemojuvelin
<b>HTF</b>	human tubal fluid, lidská tubální tekutina
<b>IBMX</b>	3-isobutyl-1-methylxantin

<b>ICSI</b>	intracytoplasmic sperm injection, intracytoplazmatická injekce spermií
<b>IVF</b>	<i>in vitro</i> fertilization, <i>in vitro</i> fertilizace
<b>IVM</b>	<i>in vitro</i> maturation, <i>in vitro</i> zrání
<b>LH</b>	luteinizing hormone, luteinizační hormon
<b>mDNA</b>	mitochondrial DNA, mitochondriální DNA
<b>MII</b>	meiosis II, meióza II
<b>mHTF</b>	modified human tubal fluid, modifikovaná lidský tubální tekutina
<b>MPF</b>	maturing-promoting factor, faktor podporující zralost
<b>NOBOX</b>	NOBOX oogenesis homeobox
<b>PGC</b>	primordial germ cell, primordiální zárodečné buňky
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline, fosfátový pufr
<b>PMSG</b>	pregnant mare serum gonadotropin, koňský sérový gonadotropin
<b>PNT</b>	pronuclear transfer, přenos prvojader
<b>SNPs</b>	single-nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
<b>ST</b>	spindle transfer, přenos dělicího vřeténka
<b>WHO</b>	world health organization, světová zdravotnická organizace

## OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	GAMETOGENEZE.....	2
2.1	MEIÓZA.....	2
2.2	OOGENEZE A FOLIKULOGENEZE .....	3
2.3	OVULAČNÍ CYKLUS.....	3
2.4	OPLOZENÍ.....	4
2.5	RÝHOVÁNÍ.....	4
3	NEPLODNOST .....	5
3.1	MITOCHONDRIÁLNÍ PORUCHY .....	5
3.2	SNÍŽENÁ OVARIÁLNÍ REZERVA .....	6
3.3	POKROČILÝ REPRODUKČNÍ VĚK .....	7
4	PŘENOS GENETICKÉHO MATERIÁLU.....	8
4.1	PŘENOS ZÁRODEČNÉHO VÁČKU .....	9
4.1.1	POSTUP PŘENOSU ZÁRODEČNÉHO VÁČKU .....	9
4.1.2	POKUSY .....	11
4.1.3	VÝHODY A NEVÝHODY PŘENOSU ZÁRODEČNÝCH VÁČKŮ .....	13
4.2	PŘENOS DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA .....	15
4.2.1	POSTUP PRÁCE .....	16
4.2.2	POKUSY .....	17
4.2.3	VÝHODY A NEVÝHOY PŘENOSU DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA .....	18
4.3	PŘENOS PRVOJADER .....	20
4.3.1	POSTUP PRÁCE .....	21
4.3.2	POKUSY .....	22
4.3.3	VÝHODY A NEVÝHODY PŘENOSU PRVOJADER.....	24
5	ZÁVĚR.....	25

# 1 ÚVOD

Pokroky v oblasti experimentální reprodukční medicíny a asistované reprodukce otevřely cestu novým metodám manipulace s genetickým materiálem. Tyto přístupy přinášejí nejen hlubší pochopení raných fází embryonálního vývoje, ale zároveň umožňují vznik inovativních postupů k léčbě neplodnosti a prevenci mitochondriálních chorob. S rostoucím počtem párů trpících geneticky podmíněnými poruchami plodnosti nebo mitochondriálními chorobami se jsou tyto techniky čím dál tím významnější. Současně však s sebou přinášejí i mnohé etické otázky.

Klíčovým principem je přenos genetického materiálu mezi oocyty či zygotami, tzv. nuclear transfer (NT), jehož cílem je oddělit jaderný genom od mitochondriálního. Tento přístup umožňuje vytvořit oocyt či zygotu, která ponese jaderný genetický materiál biologických rodičů a zároveň zdravý mitochondriální genom dárkyně cytoplazmy.

V závislosti na vývojovém stádiu, ve kterém je přenos genetického materiálu prováděn, rozlišujeme tři hlavní metody, a to přenos zárodečného vajíčku (GVT), dělicího vřetenka (ST) a přenos prvojader (PNT). Každá z těchto metod se zaměřuje na jinou fázi vývojového stádia oocyty či zygoty – nezralý oocyt (přenos zárodečných vajíčku) zralý oocyt před oplozením (přenos dělicího vřetenka) až po oplozenou zygotu (přenos prvojader). Tyto metody představují pokročilé technologie, které nám mohou nabídnout řešení v případech neplodnosti, kde standardní asistované reprodukce a běžně používané metody selhávají, například u pacientek se sníženou kvalitou oocytů nebo s mutacemi mitochondriální DNA.

Ačkoliv zmíněné techniky vykazují značný potenciál zejména v prevenci dědičných mitochondriálních chorob, jsou zároveň předmětem odborných a společenských debat týkajících se jejich bezpečnosti, efektivity a dlouhodobých důsledků, jako je zdraví dítěte nebo etických aspektů při práci se zygotami. Cílem této práce je poskytnout přehled o současných metodách přenosu genetického materiálu mezi oocyty a zygotami. Dále se zaměřuje na biologické principy těchto metod, jejich rozdílné technické provedení a možné klinické využití. Úvodní část práce se věnuje procesu oogeneze, jenž nám umožní lepší pochopení fungování těchto metod, jejich kombinaci a vhodný moment aplikace.

## 2 GAMETOGENEZE

Během fertilizace dochází ke splynutí dvou haploidních pohlavních buněk, které vznikají pomocí gametogeneze. Gametogeneze je tedy proces, při kterém se vytvářejí gamety (pohlavní buňky, tj. u mužů spermie a u žen vajíčka) prostřednictvím meiotického dělení. Haploidní buňky obsahují pouze jednu sadu chromozomů (u lidí 23 chromozomů). Při oplození, kdy se spojí dvě haploidní buňky (vajíčka a spermie), dochází k obnově diploidního stavu. Během oplození se vytváří tedy zygota, která již obsahuje dvě sady chromozomů (například Gilbert, 2000\*).

### 2.1 MEIÓZA

Jak jsem již zmínila, gamety vznikají prostřednictvím meiózy, což je redukční typ buněčného dělení. Aby buňky dosáhly haploidního stádia, musí nejprve projít redukčním dělením, během kterého se počet chromozomů sníží na polovinu. Poté následuje ekvační dělení, při kterém jsou chromatidy rozděleny do dvou dceřiných buněk. Tato dělení jsou rozdělena na dvě fáze:

#### 1. meióza I (redukční dělení)

##### 1.1. profáze I se dále dělí na dalších 5 fází

1.1.1. leptonema – dochází ke kondenzaci chromozomů a vzniku dvouřetězcových zlomů DNA (Zickler a Kleckner 1998)

1.1.2. zygonema – homologní chromozomy se párují, pomocí synaptonemálního komplexu jsou spojeny v bivalent (Jones 2008)

1.1.3. pachynema – dochází ke crossing overu (výměna genetického materiálu mezi homologními chromozomy)

1.1.4. diplotema – homologní chromozomy se od sebe oddalují, ale zůstávají spojené v místě chiasmat (tady dochází ke crossing overu)

1.1.5. diakeneze – tvoří se kinetochory na sesterských chromatidách a dělicí vřeténko, rozpadá se jaderná membrána

##### 1.2. metafáze I – chromozomy se srovnají v ekvatoriální rovině

1.3. anafáze I – dochází k uvolnění chiasmat, homologní chromozomy se od sebe oddalují každý na opačný pól vřeténka

##### 1.4. telofáze I – chromozomy jsou v opačných pólech

#### 2. meióza II. (ekvační dělení)

Meióza II je obdobná mitóze, dochází k separaci chromatid do dceřiných buněk. Výsledným produktem je vajíčko a potenciálně tři polární tělíska

Mezi hlavní úkoly meiózy patří nejen redukce počtu chromozomů na haploidní stav, ale také zvýšení genetické variability zejména pomocí procesu crossing over, při kterém dochází k výměně segmentů mezi homologními chromozomy.

## 2.2 OOGENEZE A FOLIKULOGENEZE

Pro získání zralého oocyty je nezbytné projít dvěma složitými procesy: oogenezí, kdy se formuje vajíčko a folikulogenezí, kdy se tvoří folikul, útvar složený ze somatických buněk, které obklopují vajíčko a zajišťující jeho výživu (Ducreux et al. 2023\*). Oba tyto procesy jsou úzce propojeny a tvoří základ pro vývoj oocytů v prenatalním stádiu.

Primordiální zárodečné buňky (PGC) slouží jako prekurzory samičích i samčích pohlavních buněk. Během fetálního vývoje PGC diferencují na oogonie, jež se mitoticky dělí a zvyšují tak svůj počet. Přestože oogonie dosahují ve fetálním stádiu svého maximálního počtu zhruba 6,8 milionů, jejich počet postupně klesne na zhruba 1 milion (Baker 1963). Ženy se tedy narodí s konečným počtem vajíček, zatímco u mužů probíhá tvorba spermií (spermatogeneze) po celý život. Některé oogonie projdou atrézií (zánikem) a některé vstupují do prvního meiotického dělení a poté se diferencují na primární oocyty. Oogonie, které vstoupí do meiózy jsou zastaveny v profázi I, v diplotenním klidovém stádiu, jako tzv. primární oocyt. V tomto stádiu setrvávají do nástupu menstruačního cyklu v pubertě.

Jádro nezralého oocyty se nazývá zárodečný váček (GV). Nejranější folikuly, tzv. primordiální folikuly, se skládají z oocyty zastaveného v profázi I meiózy, obklopeného jednou vrstvou plochých folikulárních buněk (také granulózních buněk) (Dunlop a Anderson 2014\*). Jak folikul roste, vzniká sekundární folikul charakterizovaný několika vrstvami kubických granulózních buněk, které obklopují primární oocyt. V této fázi se mezi granulózními buňkami vytvářejí malé dutiny, které se postupně spojují a vytvářejí antrum (dutinou vyplněnou tekutinou), tzv. antrální folikul. Zároveň mezi oocytem a granulózními buňkami se nachází vrstva glykoproteinů zvaná zona pellucida. Během profáze I dochází k rozpadu zárodečného váčku (GVBD), to umožní obnovení meiózy I a přechod do metafáze I. Při dokončení meiózy I se primární oocyt rozdělí na dvě buňky, polární tělísko s minimální cytoplazmou a sekundární oocyt a většinou cytoplazmy. Sekundární oocyt vstupuje do druhého meiotického dělení a je zastaven v metafázi II. Dělení je dokončeno pouze v případě oplození.

## 2.3 OVULAČNÍ CYKLUS

Ovulace je proces, při němž dochází k uvolnění zralého vajíčka z vaječníku, a může být spojena s následným oplozením vajíčka spermií. Pokud dojde k oplození, vajíčko se přesune do dělohy, kde se vzniklé embryo implantuje do děložní sliznice. V případě, že nedojde k oplození, vajíčko je vypuzeno z těla během menstruačního krvácení. U žen dochází k ovulaci nejčastěji 14. den osmadvacetidenního menstruačního cyklu.

Velkou roli při uvolňování vajíčka hrají folikulární buňky, které obklopují samotný oocyt a zajišťují jeho výživu. Hormony, které stimulují ovulaci, jsou produkovány v hypofýze, a jsou to především folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). FSH stimuluje růst několika folikulů, ale pouze jeden dosáhne plné zralosti (dominantní folikul). LH způsobí rupturu folikulu a následné uvolnění vajíčka do vejcovodu (ovulace). Po ruptuře folikulu vzniká žluté tělísko, které uvolňuje hormon

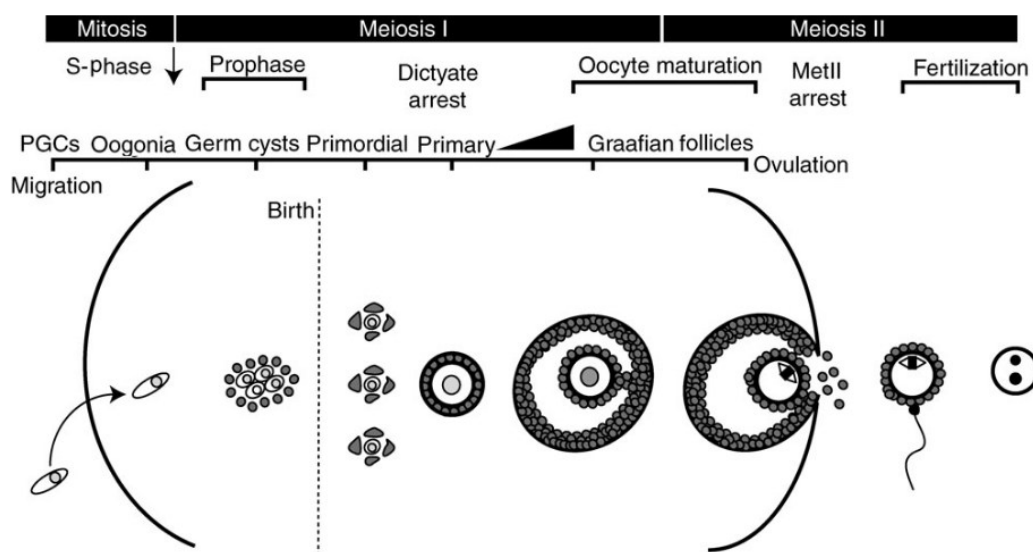
progesteron. Žluté tělísko zůstává ve vaječniku, dokud nedojde k oplodnění. Ve vejcovodu je vajíčko vychytáváno řasinkovým epitelem a postupně se posouvá směrem k děloze.

## 2.4 OPLOZENÍ

Oplození je proces, při kterém se spermie setká se sekundárním oocyt, což vede k fúzi genetického materiálu a vytvoření diploidní zygoty. K oplození dochází v ampule vejcovodu. Při kontaktu spermie s vajíčkem dochází k akrozomové reakci, která umožní vniknutí spermie do vajíčka. V okamžiku, kdy se hlavička spermie dotkne povrchu vajíčka, vajíčko podstoupí kortikální reakci. To zabraňuje proniknutí dalším spermii a tím i polyspermii. Ve chvíli, kdy spermie pronikne do vajíčka, dojde k dokončení druhého meiotického dělení, při kterém vzniká druhé polární tělísko a samičí prvojádro. Z celé oogeneze vznikne jeden zralý oocyt a potenciálně tři polární tělíska, na rozdíl od spermatogeneze, která vede k vzniku čtyř funkčních spermií. Následuje fúze jader spermie a vajíčka za vzniku zygoty.

## 2.5 RÝHOVÁNÍ

Po oplodnění následuje proces rýhování, při které se zygoty začne dělit. To zahrnuje několik sérií mitotických dělení, při nichž se cytoplazma vajíčka rovnoměrně rozdělí do menších buněk, nazývané blastomery. Rýhování není doprovázeno růstem buňky. Postupným dělením vzniká morula, jež se skládá z několika desítek buněk. Následně vzniká blastocysta, jejíž obsah je tvořen embryoblastem (vnitřní buněčná masa). Z blastocysty se vyvíjí samotné embryo a trofoblast (vnější buněčná masa), z něhož se formují buněčné obaly, placenta a dále se podílí na implantaci do děložní sliznice. Tento proces je klíčovým krokem po zahájení úspěšného těhotenství.



Obrázek 1 znázorněný život savčího oocyty počínaje jeho vznikem z oogonie až po oplození (vpravo), které znamená dokončení meiózy a vstup do buněčného dělení zygoty (Jones 2008)

### 3 NEPLODNOST

Dle WHO, světové zdravotnické organizace, bychom mohli neplodnost charakterizovat jako onemocnění mužského nebo ženského reprodukčního systému, které je definováno jako neschopnost dosáhnout těhotenství po 12 měsících nebo déle pravidelného nechráněného pohlavního styku. Neplodnost můžeme dále dělit na primární a sekundární. U primární neplodnosti žena nikdy nedosáhla těhotenství, naopak u sekundární neplodnosti nedojde k početí, přestože v minulosti byla žena už těhotná (Zegers-Hochschild et al. 2017). S neplodností se potýká velká část populace, zasahuje 1 z 6 lidí (*Infertility Prevalence Estimates, 1990-2021* 2023). Mezi faktory, které ovlivňují prevalenci neplodnosti patří věk, pohlaví, demografie a socioekonomický status.

Příčiny neplodnosti mohou mít různou povahu, můžeme mezi ně řadit poruchy ovulace, snížená ovariální rezerva, anatomické, endokrinní, genetické, funkční nebo imunologické abnormality reprodukčního systému, chronická onemocnění nebo sexuální stavy nekompatibilní s pohlavním stykem (Zegers-Hochschild et al. 2017). Existují i případy, kdy příčina není známá, takovým typům neplodnosti se říká idiopatické (The Guideline Group on Unexplained Infertility et al. 2023). V mnoha případech, nejsou příčiny neplodnosti jasně známé, se páry uchylují k umělému oplodnění (IVF), které jim může poskytnout možnost dosáhnout těhotenství i v situacích, kdy to přírodní cestou selhává.

Léčba neplodnosti může zahrnovat různé postupy, jako je například nasazení medikace, chirurgické zákroky nebo asistovaná reprodukce (ART). Mezi nejznámější metody asistované reprodukce bychom mohli zařadit IVF, při které dochází k mimotělnímu oplodnění, a intracytoplazmickou injekci spermií (ICSI), kde je jedna spermie injikována do oocyty.

Existují i příčiny neplodnosti, jež nelze efektivně řešit pomocí standardních technik asistované reprodukce. Jsou to např. mitochondriální choroby, snížená ovariální rezerva nebo pokročilý reprodukční věk. Možnosti léčby těchto stavů jsou velmi limitované, proto se mnoho žen rozhoduje pro dárcovství vajíček (Lutjen et al. 1984; Sauer, Paulson, a Lobo 1990). Tato metoda může výrazně zlepšit šanci na úspěšnou léčbu, ale děti narozené tímto způsobem nejsou geneticky příbuzné svým matkám. Nyní existují způsoby, díky nimž bychom mohli tyto konkrétní stavy zmírnit či jim předejít, a navíc umožňují rodinám mít geneticky příbuzné potomky. Jedná se o techniku přenosu genetického materiálu. Tyto metody jsou však z větší části stále experimentální, nicméně v současné době již existuje celá řada výsledků při testování na zvířecích modelech. Díky nim již byly důkladně modelovány zmíněné specifické případy neplodnosti.

#### 3.1 MITOCHONDRIÁLNÍ PORUCHY

Mitochondrie je buněčná organel vyskytující se v eukaryotických buňkách. Řadíme ji mezi semiautonomní organely, které před miliony lety zřejmě žily jako volné prokaryotické buňky a později byly pohlceny eukaryotickou buňkou (John a Whatley 1975). Tato teorie vysvětluje původ vlastní

membrány a DNA (mtDNA). Mitochondriální DNA je děděna po mateřské linii (matroklinní dědičnost). Řada důležitých reakcí se odehrává právě v mitochondrii, patří mezi ně citrátový cyklus, oxidativní fosforylace, beta oxidace, metabolismus pyruvátu a syntéza mastných kyselin. Dále se mitochondrie podílí na regulaci apoptózy a produkci FeS center.

Z hlediska oogeneze je pravděpodobně jednou z jejich nejdůležitější rolí tvorba adenosintrifosfát (ATP). ATP oocyty využívají během zrání, při sestavení dělicího vřeténka a segregaci chromozomů a chromatid. Mitochondriální dysfunkce patří mezi cytoplazmatické faktory, které jsou spojeny s nedostatečným vývojem oocyty (Blerkom, Davis, a Lee, b.r.). Mitochondriální mutace mohou způsobovat různé mitochondriální choroby. Mitochondriální mutace mohou být homoplasmické (všechny kopie mtDNA jsou mutantní) nebo heteroplasmické (přítomnost stejných či různých mutantních i wild-type mtDNA) (Hyslop et al. 2016).

Mitochondriální choroby jsou relativně častá onemocnění, postihují přibližně 1 z 50000 lidí (Gorman et al. 2015). Tyto choroby mají širokou variabilitu, mohou se vyskytnout v jakémkoliv věku a postihovat jakoukoliv tkáň i orgán, přičemž obvykle postihují ty, které jsou závislé na oxidativní fosforylaci (McFarland, Taylor, a Turnbull 2002). Jednou z nejčastějších mitochondriálních chorob je Leighův syndrom, neurodegenerativní onemocnění, jehož první projevy se objevují v dětství a vedou k závažnému zhoršení zdravotního stavu pacientů. Příznaky této nemoci obvykle zahrnují dysfunkci mozku nebo bazálních ganglií, respirační abnormality, dystonie nebo hypotonie (McFarland, Taylor, a Turnbull 2002). Za příčinu se považuje selhání oxidačního metabolismu v mitochondriích ve vyvíjejícím se mozku, což vede k progresivnímu poškození nervového systému. V případě, kdy oocyt nese mutované mitochondrie hrozí narození potomka s výše zmíněným syndromem.

## 3.2 SNÍŽENÁ OVARIÁLNÍ REZERVA

Ovariální rezerva odkazuje na počet funkčních a kvalitních oocytů a udává reprodukční potenciál („Testing and Interpreting Measures of Ovarian Reserve: A Committee Opinion" 2015). Mezi faktory, které mohou ovariální rezervu ovlivnit řadíme věk, genetickou výbavu nebo enviromentální podmínky (Tal a Seifer 2017\*). Snížená ovariální rezerva (DOR) označuje pokles kvality a kvantity oocytů a je častou příčinou neplodnosti. Diagnóza se stanovuje na základě sníženého počtu antrálních folikulů (AFC) při ultrazvukovém vyšetření nebo na základě abnormálních hodnot sérového vyšetření (tj. zvýšení hladiny FSH a nízké hladiny anti-Mülleriánského hormonu (AMH)) u žen, které mají pravidelný menstruační cyklus (Sills, Alper, a Walsh 2009). DOR dána věkem, okolo 40 let se považuje za normální fyziologický jev. U některých žen se však DOR objevuje dříve než ve 40 letech, a to je považováno za patologický stav. Lze předpokládat, že genetická výbava hraje roli ve vývoji DOR. Nesbit et al. 2020\*) shrnuli výsledky studií, které se zabývaly výskytem mutací a polymorfismů (SNPs) v genech, u kterých se předpokládá, že souvisí s DOR. Jejich zjištěním bylo, že ženy s touto diagnózou mají zvýšené riziko

výskytu premutace v genu *FMRI* (fragile X mental retardation 1), mutace v genu *FMR2* (fragile X mental retardation 2) nebo některých polymorfismech v genech *BMP15* (bone morphogenetic protein 15), *GDF9* (growth differentiation factor 9), *FSHR* (follicle-stimulating hormone receptor) a *NOBOX* (NOBOX oogenesis homeobox) (Nesbit et al. 2020). *FMRI* gen se nachází na dlouhém raménku X chromozomu a kóduje protein *FMRP* (fragile X mental retardation protein), který se nachází převážně v zárodečných buňkách (Nesbit et al. 2020\*). Premutace *FMRI* genu může způsobit střední opakování trinukleotidů CGG (mezi 52 a 2000 opakování) (Fu et al. 1991). Překročení 200 opakování trinukleotidů CGG vede k transkripčnímu umlčení genu, taková mutace způsobuje absenci *FMRP* a způsobuje syndrom fragilního X (Pieretti et al. 1991; Oberlé et al. 1991). Snížená ovariální rezerva postihující mladé i staré ženy může představovat komplexní problém a výrazně ovlivňuje jejich reprodukční schopnosti.

### 3.3 POKROČILÝ REPRODUKČNÍ VĚK

Těhotenství v pokročilém věku matky (> 35 let) (AMA) je považováno za rizikové, neboť může mít nepříznivé důsledky jak pro matku, tak pro dítě. Mezi časté komplikace patří vyšší míra chromozomálních abnormalit, spontánních potratů, předčasných porodů nebo narození mrtvého dítěte (Petitti 1987; Fretts a Usher 1995; Balayla et al. 2011).

Aneuploidie, které jsou způsobeny chybnou segregací chromozomů převážně během prvního meiotického dělení, jsou hlavní překážkou při dosažení těhotenství, až 20 % lidských oocytů jsou považovány za aneuploidní a předpokládá se, že se míra aneuploidií zvyšuje s věkem matky (Pacchierotti et al. 2007; Pan et al. 2008; Jones 2008). S pokročilým věkem matky se může zhoršovat i kvalita oocytů a funkčnost mitochondrií, což může vést ke zvýšenému riziku potratu a snížené míře plodnosti (Gaulden 1992; Wilding et al. 2001). Věk matky déle může ovlivnit mitochondriální respiraci v časných embryích, která je úzce souvisí s rychlostí vývoje (Wilding et al. 2001; Igarashi et al. 2016). Snížená aktivita mitochondrií v oocytech starších žen může tedy přispívat ke snížení vývojového potenciálu embryí.

## 4 PŘENOS GENETICKÉHO MATERIÁLU

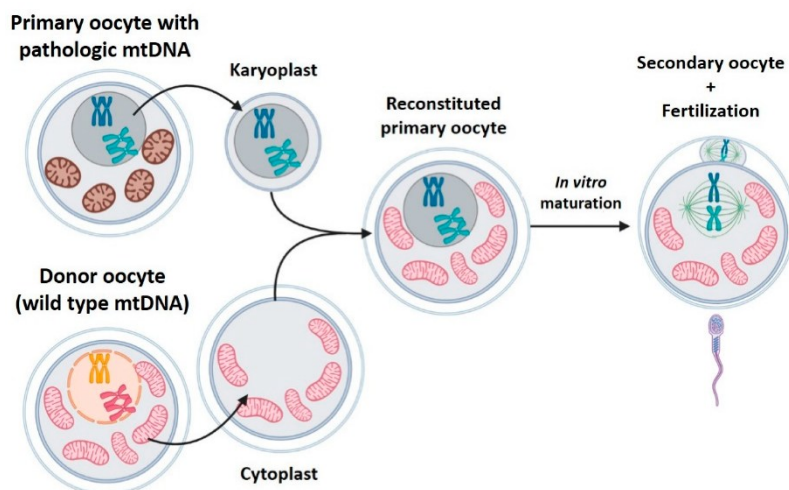
Společným jmenovatelem pro techniky využívající přenos genetického materiálu je výměna defektní cytoplazmy, ať už je způsobena mitochondriálními poruchami, DOR nebo AMA. Cílem těchto technik je předejít neplodnosti, která se v objevuje v souvislosti se zmíněnými stavy. Obecně se jedná o přenos genetického materiálu z oocytu dárkyně (donorky genetického materiálu) do enukleovaného (oocyt bez jaderné genetické informace) přijímajícího oocytu (donorky cytoplazmy) ve stejné vývojové fázi. V případě mitochondriálních chorob je důležité klást důraz na zamezení přenosu mutované mitochondriální DNA z matky na dítě. Toho je docíleno přenosem minimálního objemu cytoplazmy. Ženy s těmito problémy mají možnost mít biologické dítě a zároveň se zamezí přenosu mutované mtDNA (Neupane et al. 2014\*).

Rozlišujeme tři různé metody přenosu genetického materiálu v závislosti na vývojovém stádiu, ve němž je přenos prováděn. K přenosu zárodečných váčků (GVT) dochází u nezralých oocytů, které jsou zastaveny v profázi I. K přenosu dělicího vřeténka (ST) se využívají oocyty v metafázi II druhého meiotického dělení, tedy před oplozením, a nakonec při přenosu prvojader (PNT) jsou použity oplozené zygoty. V následující části jsou jednotlivé metody popsány podrobněji.

## 4.1 PŘENOS ZÁRODEČNÉHO VÁČKU

Přenos zárodečných váčků (GVT) je metoda, která se používá v oblasti reprodukční medicíny. Tato technika zahrnuje přenos zárodečného váčku oocyty, které je pozastavené v profázi meiózy a obsahuje dvě sady chromozomů. Tento proces se tedy provádí ještě před dokončením zrání oocytů a jejich zastavení v meióze II.

Tato metoda může být použita ke studiu interakce mezi cytoplazmou a jádrem u nezralých oocytů (Zhang 2015\*). Zároveň má potenciál přispět ke zlepšení kvality oocytů, což je může být obzvlášť důležité u žen vyššího reprodukčního věku. U těchto žen bývají pozorovány časté abnormality dělicího vřeténka a chromozomálními aberace, které mají negativní dopad na úspěšnost reprodukce. Přestože se stále jedná z větší části o experimentální metodu, tato technika by potenciálně mohla sloužit k léčbě neplodnosti spojenou i s DOR.



Obrázek 2 znázorňuje GVT, kdy dochází k přenosu zárodečného váčku v podobě karyoplastu jednoho oocyty do cytoplasmu druhého oocyty (Sendra et al. 2021\*)

### 4.1.1 POSTUP PŘENOSU ZÁRODEČNÉHO VÁČKU

Metoda GVT pracuje s nezralými oocyty, což ji odlišuje od jiných metod, které se zaměřují na zralé oocyty a pokročilejší vývojová stádia. Manipulace s nezralými oocyty vyžaduje precizní techniku jak mikromanipulace, tak elektrofúze. Dalším klíčovým faktorem této metody je nutnost *in vitro* zrání (IVM). Existuje spousta variací postupu, pro svoji práci jsem vybrala kombinaci postupů provedených na modelu laboratorní myši podle H. Liu et al. (1999), Cui, Huang, a Sun (2005) a Zhang a Liu (2015).

#### **4.1.1.1 HORMONÁLNÍ STIMULACE A KULTIVACE OOCYTŮ**

Před samotným odběrem je nutná hormonální stimulace ovarií, která se nejčastěji provádí pomocí 5 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) (H. Liu et al. 1999; Cui, Huang, a Sun 2005; Zhang a Liu 2015). Tato látka vykazuje podobnou aktivitu jako FSH a podporuje růst folikulů. Nezralé oocyty jsou odebrány pomocí punkce ovariálních folikulů a kumulární buňky jsou odstraněny opakovaným pipetováním nebo krátkým působením v HTF (human tubal fluid) mediu obsahujícím 300 IU/ml hyaluronidázy (H. Liu et al. 1999; Cui, Huang, a Sun 2005). Poté jsou oocyty v GV stádiu kultivovány například v médiu HTF doplněném o 10 % FCS (fetal bovine serum) a 50 µg/ml IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), které brání rozpadu jaderné membrány (GVBD) a zabraňuje předčasnému zrání.

#### **4.1.1.2 MIKROMANIPULACE A PŘENOS ZÁRODEČNÉHO VÁČKU**

Před samotným přenosem jsou oocyty kultivovány 15-30 minut v HTF mediu s 10 % FCS doplněném o 7,5 g/ml cytochalasinu B, jež narušuje mikrofilamenta a zvýší tím pružnost plazmatické membrány (H. Liu et al. 1999; Zhang a Liu 2015; Zhang 2015). Samotný přenos se provádí pomocí mikropipety, která pronikne skrz zonu pellucida a nasaje zárodečný váček spolu s tenkou vrstvou cytoplazmy (karyoplast). Cytoplast (cytoplazma zbavená jádra) oocytů v GV stádiu je získán stejným způsobem. Karyoplast je následně přenesen do perivitellinního prostoru enukleovaného oocytu (cytoplastu). Takto vzniklý buněčný komplex je inkubován po dobu 30 minut v M2 mediu při 37 °C, 5% koncentrací CO<sub>2</sub> před samotnou elektrofúzí (Cui, Huang, a Sun 2005).

#### **4.1.1.3 ELEKTROFÚZE**

Fúze buněčných membrán je dosažena pomocí elektrofúze, při níž vysokonapěťové elektrické pulzy destabilizují membrány a umožňují jejich splynutí. Komplex GV-cytoplazma je vložen do fúzního media (0,3 mol/l mannitol, 0,1 mmol/l CaCl<sub>2</sub> a 0,05 mmol/l MgSO<sub>4</sub>) mezi platinové elektrody ve fúzní komoře (H. Liu et al. 1999; Zhang a Liu 2015). Membrány splynou při elektrických impulsech 160 V/cm po dobu 90 µs nebo 1,8-2,5 kV/cm na 50 µs (H. Liu et al. 1999; Cui, Huang, a Sun 2005).

#### **4.1.1.4 KULTIVACE, AKTIVACE OOCYTŮ A OPLODNĚNÍ**

Zrání zrekonstruovaných oocytů probíhá *in vitro* v HTF mediu s 10 % FCS při 37 °C v 5 % koncentraci CO<sub>2</sub> v atmosféře (Cui, Huang, a Sun 2005). Zralé oocyty, u nichž je přítomno první polární tělísko (indikuje úspěšný průběh meiotického dělení), jsou odebrány pro další využití. Tyto oocyty jsou uměle aktivovány například umístěním do PBS (fosfátový pufr) s 3 µM látky A23187 (vápenatý ionofor), poté jsou opláchnuty v HTF mediu, a nakonec kultivovány v HTF mediu doplněném o 10 % FCS a 7 µg/ml

cykloheximidu, inhibitoru syntézy proteinů, čímž dojde k aktivaci oocytů (Hagemann et al. 1995). A23187 přenáší kationy (zejména vápníkové ionty) přes buněčnou membránu, při aktivaci je využíván ke zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, což je klíčový signál pro spuštění meiózy, a tedy aktivace oocytů (Hagemann et al. 1995). Poté jsou oocyty kultivovány *in vitro* v HTF mediu s 10 % FCS v 5 %  $\text{CO}_2$  a dále je monitorována aktivace indikovaná přítomností samičího prvojadra.

Zralé oocyty mohou být také oplozeny *in vitro* bez umělé aktivace podle protokolu shrnutém v Cui, Huang, a Sun 2005). Oocyty jsou spolu se spermii inkubovány v IVF mediu v 15 mg/ml BSA (bovine serum albumin). Dále jsou oocyty kultivovány *in vitro* v HTF mediu v 10 % FCS při 37 °C a 5 %  $\text{CO}_2$ . Následně je sledována přítomnost prvojadra a dvoubuněčného embrya (Cui, Huang, a Sun 2005).

#### 4.1.2 POKUSY

Metoda GVT představuje inovativní přístup k léčbě neplodnosti, kdy dochází k přenosu zárodečného vajíčku oocytu dárkyně do cytoplazmy příjemkyně. Tato metoda nejenže pomáhá překonat chromozomální abnormality, ale také umožňuje prevenci aneuploidii u žen s DOR pokročilosti s věkem. Schopnost zrání a meiotického dělení lidského oocytu vyžaduje jak cytoplazmatickou, tak jadernou část.

##### 4.1.2.1 PŘENOS MYŠÍCH ZÁRODEČNÝCH VÁČKŮ

H. Liu et al. (1999) provedli studii zaměřenou na schopnost zrání u myších oocytů, které byly zrekonstruované pomocí GVT. V tomto experimentu byla část zárodečných vajíček přenesena do oocytů v GV stádiu a část do MII oocytů nebo zygot. Zkoumalo se, zda takto zrekonstruované oocyty jsou schopny zránit a normálně se vyvíjet do stádia blastocysty. Po *in vitro* kultivaci nebyl zaznamenán výrazný rozdíl v míře zrání oocytů. Nicméně z výsledků vyplynulo, že pouze 20 % oocytů zrekonstruovaných přenosem GV do MII oocytů podstoupilo GVBD a žádný z těchto oocytů nedosáhl MII stádia, přestože hladina MPF (maturation promoting factor: proteinový komplex složený z cyklin-dependentní kinázy 1 a cyklinu B, který reguluje iniciaci meiózy) byla vysoká. Toto zjištění bylo překvapivé, jelikož MPF je klíčový pro zahájení meiózy. Na druhou stranu zárodečné vajíčky přenesené do oocytů stejného stádia vykazovaly přítomnost prvního polárního tělíska (H. Liu et al. 1999). Z toho vyplývá, že zrekonstruované oocyty stejného vývojového stádia jsou schopny podstoupit GVBD a vstoupit do prvního meiotického dělení. Dále bylo prokázáno, že tato metoda nijak nenarušuje strukturální a funkční integritu zárodečného vajíčka a přijímací cytoplazmy. Toto nám umožňuje přenášet zárodečné vajíčky mezi různými oocyty, například mezi oocyty různých věkových kategorií nebo kvalit. To dává této technice potenciál v oblasti reprodukční medicíny, což může být důležité při léčbě neplodností spojené s vysokým věkem nebo DOR, jak bylo uvedeno v úvodní sekci. Na druhou stranu tato studie

jednoznačně ukazuje, že je nutné dodržet kompatibilitu mezi genetickým materiálem (jádem) a cytoplazmou. V rámci přenosu genetického materiálu nelze tedy použít různá stádia dárcovských a oocytů dárkyně, například GV-MII.

#### **4.1.2.2 PŘENOS ZÁRODEČNÝCH VÁČKU NA LIDSKÝCH OOCYTECH**

První pokus o GVT na lidských oocytech provedli Zhang et al. (1999). Ve své studii zkoumali schopnost zrání zrekonstruovaných oocytů po podstoupení mikromanipulace. Pro tento experiment byly použity oocyty žen v různém věkovém rozmezí (25-42 let). Oocyty ve stádiu GV (profáze meiózy I) byly rozděleny na dvě skupiny podle věku žen, první skupina zahrnovala oocyty mladších žen (<31 let) a druhá skupina zahrnovala oocyty starších žen (>38 let), následoval GVT (Zhang et al. 1999). Studie byla rozdělena do dvou experimentů. V prvním byly zárodečné váčky přeneseny do stejných oocytů, aby se zjistilo, zda tento postup neovlivňuje schopnost oocytů zrát. Ve druhém experimentu byly zárodečné váčky pocházející od starších žen přeneseny do enukleovaných oocytů mladých žen. Výsledky ukázaly, že v prvním experimentu se úspěšně podařilo zfúzovat 14 oocytů, přičemž se u 9 z nich objevilo první polární tělísko, míra zrání tedy dosáhla 64 % (Zhang et al. 1999). Ve druhém experimentu se podařilo zrekonstruovat 12 oocytů, u 7 z nich bylo pozorováno první polární tělísko (58 % úspěšnost zrání) a u 80 % zrekonstruovaných oocytů autoři pozorovali normální průběh druhého meiotického dělení (Zhang et al. 1999). Tato studie prokázala, že zrekonstruované oocyty jsou schopny vstoupit do prvního meiotického dělení. Výsledky také naznačují, že GVT mezi oocyty různě starých žen může potenciálně zlepšit kvalitu oocytu, což by mohlo být významné při léčbě neplodnosti zejména u starších žen.

#### **4.1.2.3 PŘENOS STARÝCH ZÁRODEČNÝCH VÁČKŮ DO MLADÉ CYTOPLAZMY**

Přestože výše zmíněné studie ukazují potenciální pozitivní výsledek postupu, tato metoda může být spojena i s jistými riziky. Cui, Huang, a Sun (2005) ve svém studiu zkoumali, zda je cytoplazma oocytu z mladé myši je schopna překonat chybné chromozomální uspořádání během meiózy v oocytu staré myši. Ke studiu sloužily myší oocyty, které byly následovně rozděleny do tří skupin: mladý GV – mladá cytoplazma (YY: Young GV-Young cytoplasm), starý GV – mladá cytoplazma (AY: Advanced Age GV - Young cytoplasm), mladý GV – stará cytoplazma (YA: Young GV – Advanced Age cytoplasm). Podle těchto skupin byly pomocí mikromanipulace a elektrofúze zrekonstruovány oocyty. Data získané v této studii ukazují, že mladá cytoplazma nemohla zabránit chybnému chromozomálnímu uspořádání během meiózy pocházející ze starší myši. Existují dvě možná vysvětlení, proč tomu tak mohlo být. Prvním důvodem může být absence jaderného materiálu v cytoplazmě oocytu mladé myši. Při enukleaci došlo k odstranění celého zárodečného váčku z cytoplazmy a je známo, že uspořádání chromozomů převážně závisí na zárodečném váčku (Gao et al. 2002; Cui, Huang, a Sun 2005). Druhým možným vysvětlením je, že chybné faktory pocházející ze zárodečného váčku staré myši mohou být navázány na

chromozomy a dělicí vřeténko, a tím tak omezit „záchranný efekt“ z cytoplazmy mladé myši. U oocytů skupiny AY nebyla zjištěna zvýšená míra chybných uspořádání chromozomů. Z toho vyplývá, že pro určení integrity chromozomů a vřeténka je zásadní jaderný materiál, nikoliv cytoplazma. Tato studie tedy ukazuje hlavní limitaci metody GVT. Využití této metody tak může být problematické především u léčby neplodnosti spojené s věkem.

#### 4.1.3 VÝHODY A NEVÝHODY PŘENOSU ZÁRODEČNÝCH VÁČKŮ

Přestože některé výsledky studií potvrzují efektivitu této metody, je důležité zohlednit i komplikace, které může tato metoda přinášet. Jak jsem již zmínila na začátku, technika GVT je stále v experimentální fázi, a stejně jako u každé experimentální reprodukční technologie i zde existují obavy týkající se bezpečnosti a účinnosti.

Jednou z hlavních výhod této metody je načasování GVT. Chybné uspořádání chromozomů během metafáze I může vést k chybné segregaci chromozomů a vzniku aneuploidií (L. Liu a Keefe 2004). Míra aneuploidie roste s věkem, což přispívá k nízké kvalitě oocytů způsobující neplodnost spojenou s AMA (Hassold a Chiu 1985; Navot et al. 1991). Jelikož GVT probíhá ještě před znovuzahájením meiotického dělení, mohlo by se tím předcházet přenosu aneuploidie přítomné v jádře oocyty. Zároveň se jedná o techniku, která je méně invazivní v porovnání s přenosem chromozomů zralých oocytů, jelikož je zárodečný váček chráněn jaderným obalem (Zhang 2015). Jaderný obal hraje roli v organizaci a ve správné funkci jádra, dává mu tvar, tvoří jeho mechanickou ochranu a také funguje jako bariéra mezi jadernými a cytoplazmatickými procesy (Burke a Ellenberg 2002; Fulka et al. 2019). K jeho rozpadu dochází až těsně před prvním meiotickým dělením.

Hlavní nevýhodou této metody je nutnost zrání oocytů *in vitro*. *In vitro* zrání snižuje potenciál růstu oocytů, což může být způsobeno řadou faktorů, jako jsou podmínky, metoda nebo délka doby kultivace (Yang et al. 2021). Oocyty, které nemají možnost optimálně zrát, mohou mít omezenou schopnost správně segregovat chromozomy během meiózy, a to může vést ke vzniku aneuploidií nebo špatné kvalitě embryí. Pokud bychom byli schopni určit optimální podmínky pro *in vitro* zrání, mohli bychom být o krok blíže k úspěšným výsledkům GVT a jeho širší aplikaci v klinické praxi. Při manipulaci oocytů se také používá cytochalasin B – metabolit produkovaný některými houbami. Tato látka inhibuje tvorbu filamentárního aktinu (F-aktin) a tím potlačuje buněčné pohyby včetně cytoplazmatického dělení, umožňuje tak snazší manipulaci s oocyty (Smith, Ridler, a Faunch 1967; Carter 1967; Stossel 1978). Je důležité zmínit, že cytochalasin B je toxický a při vdechnutí nebo požití může mít vážný vliv na zdraví, proto manipulace s ním musí být opatrná.

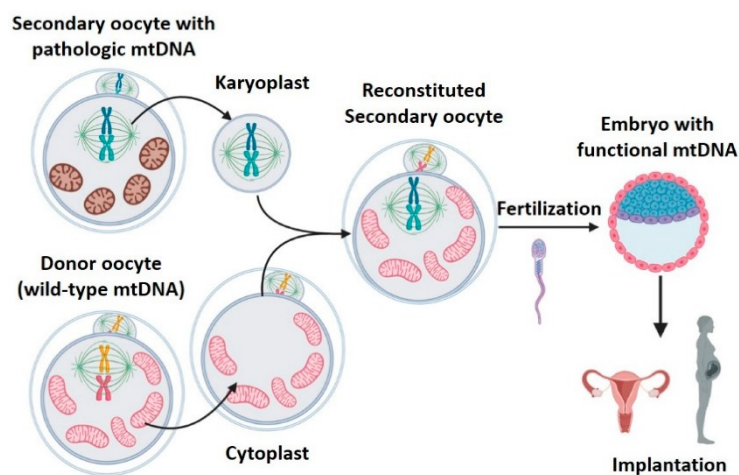
V případě použití GVT za účelem potlačení mitochondriálních chorob může být další komplikací spojenou s touto metodou riziko přenosu mitochondrií nacházejících se vedle zárodečného váčku. To je

dáno především velikostí manipulační pipety, která musí pojmout celý zárodeční váček a nepoškodit ho. Takový přenos může vést k mitochondriální heteroplasmii (přítomnost více mtDNA druhů v buňce) (Zhang 2015). Stupeň heteroplasmie by mohl mít vliv na vývoj oocyty a potomstvo (Yabuuchi et al. 2012\*). Zamezení přenosu mtDNA vyžaduje zdokonalení jednotlivých postupů, což vyžaduje vysokou technologickou přesnost, kterou v současné době zatím nesplňují.

## 4.2 PŘENOS DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA

Metoda přenosu děličího vřeténka (ST) je pokročilá metoda, která se využívá k léčbě genetických onemocnění, především mitochondriálních poruch, ale může být využita i k léčbě některých typů neplodnosti (Zhang et al. 2017; Costa-Borges et al. 2023). K přenosu slouží děličí vřeténko, jež získáme během druhého meiotického dělení z oocyty pacientky (Tachibana et al. 2009; Costa-Borges et al. 2020). Děličí vřeténko je možné vizualizovat pomocí dvojlohu polarizovaného světla, což umožňuje přenos děličího vřeténka spolu s chromozomy (Herbert a Turnbull 2018). Konkrétně se při této metodě přenáší děličí vřeténko z vajíčka ženy, které obsahuje například poškozenou mtDNA, do oocyty dárkyně obsahující zdravou mitochondriální populaci. Tento zrekonstruovaný oocyt je následně oplodněn pomocí ICSI nebo IVF. Cílem této metody je snížit riziko přenosu mutantní mtDNA, a tedy mitochondriálních onemocnění na dítě. Umožní párům, jež mají genetickou predispozici k mitochondriálním chorobám, mít zdravé potomky.

Velká Británie byla první zemí, která oficiálně povolila klinické využití metody ST a PNT (Newson, Wilkinson, a Wrigley 2016). Kliniky poskytující tyto nové metody asistované reprodukce, musí být licencované a podléhají přísné regulaci HFEA (Human Fertilisation and Embryology Authority) (Mitalipov a Wolf 2014). Zajímavé je, že první ST vedoucí k narození zdravého dítěte byl úspěšně proveden v Mexiku, kde dosud neexistuje žádný zákon regulující tuto techniku (Zhang et al. 2017). Oproti tomu klinické využití této metody je přísně zakázané ve Spojených státech amerických (Palacios-González a Medina-Arellano 2017).



Obrázek 3 schéma ST, kdy dochází k přenosu děličího vřeténka v podobě karyoplastu jednoho oocyty do cytoplasmu druhého oocyty (Sendra et al. 2021\*)

## **4.2.1 POSTUP PRÁCE**

Postup metody ST je popsán podle studií Tachibana et al. (2009), Zhang et al. (2017) a Costa-Borges et al. (2023), kteří pracovali s oocyty primátů nebo lidí. U nich má právě tato metoda význam z hlediska budoucího klinického využití zejména v oblasti prevence dědičných mitochondriálních chorob. Postup u oocytů jiných živočišných druhů je velmi podobný, i když s některými modifikacemi.

### **4.2.1.1 HORMONÁLNÍ STIMULACE A ODBĚR OOCYTŮ**

Stejně jako u myších modelů pacientky i dárkyně podstoupily minimálně dva cykly hormonální stimulace a odběr oocytů, které byly provedeny podle standardních protokolů a postupů IVF (Zhang et al. 2017; Costa-Borges et al. 2023). Odebrané oocyty byly zbaveny kumulárních buněk a kultivovány.

### **4.2.1.2 IZOLACE A PŘENOS DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA**

Oocyty jsou umístěny do HEPES pufrovaného média s 10 % proteinovým doplňkem a 5-7,5 µg/ml cytochalasinu B při 37 °C, aby došlo k narušení mikrofilament a zvýšení pružnosti plazmatické membrány (Tachibana et al. 2009; Zhang et al. 2017). ST je proveden pomocí inverzního mikroskopu vybaveného mikromanipulátory. Laserem se vytvoří štěrbin v zoně pellicule (Zhang et al. 2017). Skrz tento otvor projde pipeta, která následně nasaje dělicí vřeténko společně s chromozomy matky a přeneso ho do perivitellinního prostoru přijímajícího enukleovaného oocytu.

### **4.2.1.3 FÚZE MEMBRÁN**

Následuje fúze membrán mezi dělicím vřeténkem a cytoplazmou, tedy cytoplasmem a karyoplastem, která může být provedena dvěma způsoby. Buď pomocí elektrofúze využívající vysokonapěťové elektrické pulzy k narušení membrány nebo pomocí inaktivovaného viru HJV-E, který jež podporuje buněčné splynutí (Zhang et al. 2017). Avšak druhá možnost se u lidí nepoužívá. Oocyt je před elektrofúze vložen do fúzního media (0,3 M mannitolu, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> a 0,05 mM MgSO<sub>4</sub>) mezi platinové elektrody. Elektrofúze je provedena pomocí jednoho elektrického impulsu (1,4 kV/cm, 50 µs) (Zhang et al. 2017). K fúzi membrán dochází zpravidla 30 minut po aplikaci elektrického impulsu.

### **4.2.1.4 IVF A KULTIVACE**

Zrekonstruované oocyty jsou inkubovány v Global Total mediu při 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> a 37 °C (Zhang et al. 2017). Oocyty jsou následně oplozeny jednou spermií pomocí ICSI a dále kultivovány v Global Total mediu při 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> a 37 °C do stádia blastocysty (Tachibana et al. 2009; Zhang et al. 2017)

## 4.2.2 POKUSY

Prevence přenosu mitochondriálních chorob není jediným přínosem, který může ST nabídnout. Některé studie prokázaly, že tato metoda má potenciál také v prevenci specifických typů neplodnosti. V následující část je zaměřena na tyto případy.

### 4.2.2.1 PŘENOS DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA NA LIDSKÝCH OOCYTECH

Pokus o prevenci přenosu mitochondriální choroby pomocí ST podstoupil 36 letá žena, nositelka mitochondriální mutace způsobující Leighův syndrom (Zhang et al. 2017). Tato žena měla za sebou čtyři předčasně ukončená těhotenství a dvě děti, které podlely tomuto onemocnění. Z celkových 29 odebraných oocytů bylo pět podrobena metodě ST a ICSI. Čtyři z pěti oocytů byly úspěšně oplozeny a vyvinuly se až do stádia blastocysty, přičemž u jednoho nebyla zjištěna aneuploidie. Díky této technice se povedlo na svět přivést zdravého chlapce, který měl pouze 5,7 % mutantní mtDNA. Pokud by se u chlapce v budoucnu objevily klinické příznaky, musel by podstoupit testování na drift heteroplasmie mtDNA. Chlapec do sedmého měsíce života však neprojevil žádné příznaky. Tato studie představuje první klinický pokus o ST s cílem minimalizovat přenos mateřské mitochondriální mutace na potomky a zároveň zajistit jejich zdraví.

### 4.2.2.2 PŘENOS DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA JAKO TECHNIKA PŘEKONÁVAJÍCÍ ZÁSTAVU VÝVOJE EMBRYA

Přestože původní využití ST mělo sloužit jako prevence přenosu mitochondriálních onemocnění, Costa-Borges et al. (2020) prokázali, že tato technika může sloužit i k překonání problémů s neplodností, které jsou spojeny se zastavením embryonálního vývoje v důsledku cytoplazmatické deficiencie. Ve své studii použili autoři dva myší kmény, z nichž jeden měl dobrou reprodukční schopnost a sloužil jako dárce cytoplazmy, zatímco druhý kmen vykazoval problémy s oplozením oocytů nebo vysokou frekvencí neúspěšně se vyvíjejících embryí. Z odebraných oocytů se u více než 95 % podařilo úspěšně provést enukleaci a rekonstrukci (Costa-Borges et al. 2020). Biopsie embryí ve stádiu moruly nebo blastocysty vykazovaly minimální úroveň heteroplasmie (<2,9 % mtDNA od dárkyně dělíčího vřeténka) (Costa-Borges et al. 2020). Nízká hodnota heteroplasmie byla potvrzena u dospělých jedinců a napříč pěti generacemi potomků, kteří navíc vykazovali normální plodnost. Tento výsledek poukazuje nejen na efektivitu v prevenci přenosu mitochondriálních nemocí, ale také na potenciál obnovit embryonální vývoj a zachovat plodnost napříč generacemi.

#### **4.2.2.3 PŘENOS DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA K LÉČBE IDIOPATICKÉ NEPLODNOSTI**

V roce 2023 použili Costa-Borges et al. metodu ST ke studiu léčby idiopatických neplodností v případech opakovaného selhání IVF. Do studie se zapojilo 25 žen (párů) mladších čtyřiceti let bez mitochondriálních onemocnění. U všech žen byla zaznamenána snížená kvalita oocytů, která byla označena jako hlavní faktor přispívající k jejich neplodnosti. Metoda byla provedena podle postupů popsaných Tachibana et al. (2009). Ze všech 28 provedených cyklů ST se narodilo šest dětí, u nichž nebyly zaznamenány žádné vývojové ani zdravotní komplikace (Costa-Borges et al. 2023). Při DNA fingerprintingu bylo navíc zjištěno, že tyto děti nesly výhradně DNA svých biologických rodičů, bez přítomnosti DNA dárkyně oocyty. Z těchto výsledků lze usoudit, že embrya zrekonstruovaná touto metodou jsou schopná implantace, vývoje až do porodu a mohou vést k narození zdravých dětí. Při biopsii blastocyst bylo zjištěno méně než 1 % mtDNA dárkyně cytoplazmy, avšak při narození se tato hodnota zvýšila na 30-60 % (Costa-Borges et al. 2023). Z toho vyplývá, že i když lze tímto způsobem výrazně snížit množství přenesené mitochondriální DNA, existuje riziko, že se hodnota mutantní mateřské mtDNA může výrazně zvýšit ještě před narozením.

#### **4.2.3 VÝHODY A NEVÝHOY PŘENOSU DĚLÍČÍHO VŘETÉNKA**

Zmíněné studie poukazují na pozitivní výsledky a skutečný potenciál této metody. Je však nezbytné vzít v úvahu i možná rizika a komplikace. Následující část je zaměřena na klíčové výhody a nevýhody této techniky.

Metoda ST zůstává kontroverzním tématem a může u některých lidí vyvolávat etické obavy spojené s jejím využitím. Ve srovnání s metodou PNT může být vnímána jako etičtější alternativa, jelikož přenos probíhá ještě před samotným oplozením a nedochází tak k manipulaci a narušení vzniklého embrya. Podle některých názorů mají i raná embrya hodnotu srovnatelnou s lidským jedincem. Jako příklad lze uvést matku, která z náboženských přesvědčení preferovala metodu ST před PNT (Zhang et al. 2017). Cílem této metody je snížit riziko přenosu mutantní mtDNA a zároveň potenciálně překonat určité typy neplodnosti. Umožňuje párům, které jsou nositeli mitochondriálních chorob, mít vlastní biologické děti, které tyto choroby nezdědí. Tím nabízí reálnou příležitost pro rodiny ohrožené přenosem závažných mitochondriálních chorob a naději pro děti, které by jinak trpěly těžkými zdravotními komplikacemi. Na druhou stranu však může být tento zásah do přirozené reprodukce některými lidmi vnímán jako nepřirozený. Taková obava není ojedinělá a principu se může vztahovat na jakoukoliv formu asistované reprodukce.

Přestože výše uvedené studie podporují účinnost této metody, je důležité zvážit i možné komplikace a rizika.

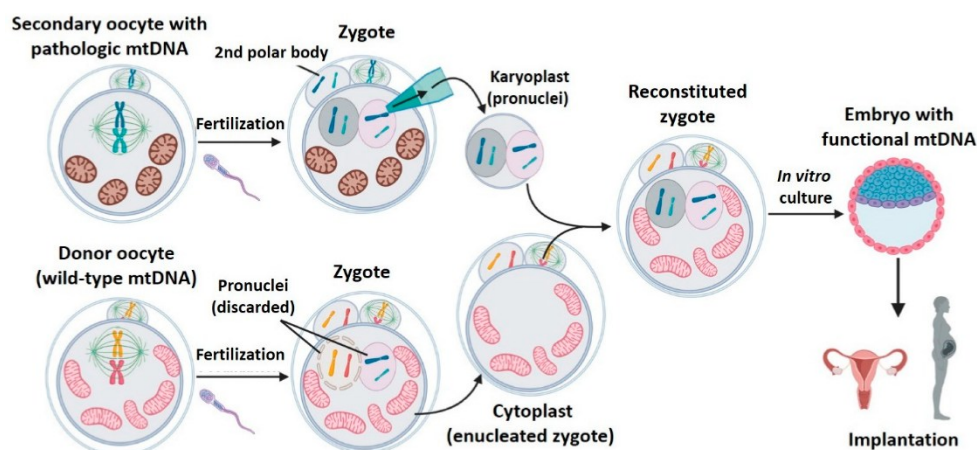
Výsledky dosavadních studií sice naznačují vysokou efektivitu, avšak metoda ST s sebou nese určitá rizika, které nelze opomíjet. Stejně jako u metody GVT, dochází i zde k manipulaci s oocyty ještě před jejich oplozením. Tyto dvě metody sdílí některé klíčové kroky procesu, jako je například použití inhibitorů a jiných chemických látek nebo prodloužený pobyt oocytů v *in vitro* podmínkách. Jak již bylo řečeno, tyto faktory mohou negativně ovlivnit vývoj oocytů a jejich kvalitu, což následně vede ke snížení pravděpodobnosti úspěšného embryonálního vývoje, a tím i celkové úspěšnosti metody. Další technickou výzvou je samotný ST, jehož chromozomy nejsou chráněny jaderným obalem, což zvyšuje riziko jejich poškození nebo ztráty (Tang et al. 2020). Pokud by k takové chybě došlo, může dojít k narušení vývoji embrya či ke genetickým abnormalitám. Z tohoto hlediska je efektivnější metoda PNT, který bude podrobněji popsán v následující sekci, jelikož přenášená prvojádra jsou chráněná jaderným obalem a případné poškození nebo ztráta jsou minimalizovaná.

Kromě technických obav vyvolává tato metoda i právní otázky. Stejně jako u ostatních technik při ST, dochází k manipulaci s třemi různými genetickými materiály (matky, otce a mtDNA dárkyně cytoplazmy). Tento proces vede k vytvoření embrya, které nese tři různé genetické informace, to může vyvolat otázky týkající se identity dítěte a dědičnosti. Jakou roli bude hrát mtDNA dárkyně na genetickou identitu dítěte? Jaký to bude mít vliv na sociální vnímání dítěte? Z právního hlediska se můžeme ptát, kdo je považován za právního rodiče dítěte? A jaká práva a povinnosti má dárkyně cytoplazmy? Je důležité si tyto otázky položit pro pochopení této metody a jejího dopadu na rodinné a právní vztahy. Během ST dochází k manipulaci s genetickým materiálem, to znamená, že jakákoliv změna se přeneše na další generaci (Palacios-González 2017). To vyvolává obavy z dlouhodobých následků a potenciálních negativních vlivů této metody.

### 4.3 PŘENOS PRVOJADER

Přenos prvojader (PNT) patří mezi další techniky přenosu genetického materiálu, které mají za cíl předejít mitochondriálním chorobám způsobeným mutacemi v mitochondriální DNA mateřského původu (Craven et al. 2010; Znachorova et al. 2024). Kromě toho umožňuje předejít určitým typům neplodnosti, kdy nefunkční cytoplazma brání správnému vývoji embrya (Zhang et al. 2016) (Craven et al. 2017). Tato metoda pracuje s oplozenými oocyty/zygotami, přičemž k přenosu slouží jedno či obě prvojádra. Ta lze vizualizovat pomocí běžné světelné mikroskopie. Vzhledem k obtížnému rozlišení jednotlivých prvojader v lidských embryích přenos zahrnuje obě dvě prvojádra zároveň (Herbert a Turnbull 2018). Tato technika vyžaduje oplození jak zdravého darovaného oocyty, tak oocyty zamýšlené matky spermatem zamyšleného otce (Reznichenko, Huyser, a Pepper 2016). Oplozené zygoty jsou kultivovány do stádia, kdy jsou viditelná prvojádra. Pomocí mikromanipulace se následně odeberou v podobě karyoplastu. Během tohoto procesu dochází k přesunu obou rodičovských prvojader z defektní zygoty do enukleované zygoty dárkyně. Výsledná zrekonstruovaná zygoty obsahuje jadernou DNA obou biologických rodičů a mitochondriální DNA dárkyně cytoplazmy.

Jak jsem již zmiňovala v předchozí kapitole, Velká Británie byla první zemí, která legalizovala klinické využití metody PNT (Newson, Wilkinson, a Wrigley 2016). Stejně jako u předchozí metody, kliniky poskytující tuto metodu musí být licencované. Přesto se první dítě počaté pomocí této techniky narodilo v roce 2017 na Ukrajině („World’s First Baby with DNA of Three Parents Was Born in Ukraine | Nadiya Family Planning Clinic“, b.r.). Jednalo se první klinické použití této metody za účelem řešení předčasného zastavení embryonálního vývoje. Vzhledem k absenci specifické legislativy, která by tuto metodu regulovala, bylo její klinické aplikace na Ukrajině možné (Ishii a Hibino 2018).



Obrázek 4 schéma PNT, kdy nejprve dochází k oplození oocytů, následuje odběr a přenos prvojader v podobě karyoplastu z jedné zygoty do cytoplasmu druhé zygoty (Sendra et al. 2021\*)

### **4.3.1 POSTUP PRÁCE**

Tato metoda představuje významný potenciál pro budoucí klinické použití, i když je její klinické využití v současnosti povoleno pouze ve Velké Británii. Pro popis postupu práce jsem si vybrala především studie Craven et al. 2010 Hyslop et al. 2016 Zhang et al. 2016), které popisují její aplikaci na lidských oocytech, což je klíčové pro posouzení klinické použitelnosti této metody. Postup u zvířecích modelů může být podobný, i když bývá místy modifikován.

#### **4.3.1.1 PŘÍPRAVA A ODBĚR PRVOJADER/OOCYTŮ**

Před samotným odběrem je opět nutné, aby ženy podstoupily hormonální stimulaci. Oocyty ve stádiu MII jsou odebrány pomocí ultrazvukové aspirace folikulů, přičemž přebytečné kumulární buňky jsou odstraněny pomocí hyaluronidázy (Zhang et al. 2016; Hyslop et al. 2016). Oocyty, u nichž je přítomné první polární tělísko jsou následně oplozeny metody ICSI.

#### **4.3.1.2 PŘENOS PRVOJADER**

Zygoty jsou před mikromanipulací kultivovány v HTF mediu s 10 % sérovým doplňkem, 10 µg/ml nocodazolu k narušení dynamiky mikrotubulů a zástavy buněčného cyklu v G2/M fázi a nakonec 5-7,5 µg/ml cytochalasinu B k narušení mikrofilament a zvýšení pružnosti plazmatické membrány. K přenosu slouží inverzní mikroskop vybavený mikroanipulátory. Laserem nebo ostrou pipetou se do zony pellucidy vytvoří otvor, skrz který může pipeta nasát prvojádra (Hyslop et al. 2016; Zhang et al. 2016). Ta jsou poté přenesena do perivitellinního prostoru enukleované zygoty.

#### **4.3.1.3 FÚZE MEMBRÁN**

Postup spojení membrán probíhá obdobně jako u metody dělicího vřetenka. Zygota je vložena do fúzního média (0,3 M mannitolu, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> a 0,05 mM MgSO<sub>4</sub>) mezi dvě platinové elektrody, kde je vystavena elektrickému impulsu (1,8-2,5 kV/cm na 50 µs), který zahájí proces fúze (Zhang et al. 2016). K samotnému splynutí membrán dochází obvykle po 30 minutách po působení elektrického proudu.

#### **4.3.1.4 KULTIVACE EMBRYA**

Zrekonstruovaná zygota je následně třikrát opláchnuta v HTF mediu a dále je kultivována *in vitro* v mHTF (modified human tubal fluid) mediu při 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C až do stádia blastocysty (Zhang et al. 2016). V průběhu kultivace blastocysty je možné genetické testování, které zajistí minimální přenos

mitochondriální DNA. To je důležitý faktor pro určení úspěšnosti PNT, je-li tato metoda aplikována za tímto účelem (Hyslop et al. 2016).

#### **4.3.2 POKUSY**

Pro hlubší porozumění principu a využití metody PNT bych ráda představila několik studií, které se zabývají její provedením a účinností. Výsledky těchto studií mohou přispět k lepšímu pochopení této techniky a jejího potenciálu v oblasti reprodukční medicíny.

##### **4.3.2.1 PŘENOS PRVOJADER NA LIDSKÝCH EMBRYÍ**

Zcela první PNT pomocí mikromanipulace byl proveden na myších embryích (McGrath a Solter 1983). Až 96 % zrekonstruovaných zygot se vyvinulo do stádia moruly nebo blastocysty, což naznačuje, že PNT z jedné zygoty do druhé nemá negativní vliv na schopnost embrya se vyvíjet (McGrath a Solter 1983).

O několik let později byla tato metoda aplikovaná také na lidských zygotách (Craven et al. 2010). Zatímco při podobných studiích se běžně používají normálně oplozené zygoty, Craven et al. (2010) ve své studii použili abnormálně oplozené oocyty, konkrétně unipronukleární (obsahující pouze jedno prvojádro) nebo tripronukleární (obsahující tři prvojádra), které vznikly metodou IVF. Cílem jejich výzkumu bylo omezit přenos mitochondriálních onemocnění z matky na dítě. Z výsledků vyplývá, že abnormálně oplozené zygoty měly omezený vývojový potenciál *in vitro* (pouze 17 % dosáhlo stádia blastocysty), v porovnání s normálně oplozenými zygoty, které měly úspěšnost 32 % (Craven et al. 2010). Přesto zygoty po PNT vykazovaly normální schopnost embryonálního vývoje, a to bez ohledu na to, zda bylo přeneseno jedno nebo dvě prvojádra. Až 8,3 % těchto zygot se vyvinulo až do stádia blastocysty, což naznačuje, že tato metoda je kompatibilní s dalším vývojem lidských embryí. Současně byla sledována míra přenosu mutantní mitochondriální DNA obsažené v embryích. Klíčovým faktorem pro její minimalizaci je co nejmenší přenos cytoplazmy obklopující prvojádra. Optimalizací tohoto postupu bylo dosaženo, že zrekonstruovaná embrya obsahovala méně než 2 % původní mitochondriální DNA (Craven et al. 2010). Tato studie tedy potvrdila, že metoda PNT je nejen kompatibilní s dalším vývojem lidských embryí ale zároveň umožňuje snížení rizika přenosu mitochondriálních chorob.

##### **4.3.2.2 KLINICKÉ POUŽITÍ METODY PŘENOSU PRVOJADER**

Zatímco PNT mezi abnormálně oplozenými lidskými zygotami byl technicky proveditelný, ukázalo se, že normálně oplozené zygoty tento postup hůře tolerují. Jejich omezená schopnost dalšího vývoje tak může představovat překážku pro další rutinnější využití této metody. PNT se obvykle provádí během

G2 fáze prvního mitotického buněčného dělení, kdy jsou prvojádra dobře viditelná. Hyslop et al. (2016) se proto zaměřili na otázku, zda načasování tohoto zásahu není příliš blízko prvnímu mitotickému dělení a zdali neovlivňuje negativně vývoj embrya. Na základě těchto úvah navrhli alternativní přístup, tzv. časný přenos prvojader (ePNT), který se uskutečnil krátce po dokončení meiózy, přibližně 8 hodin po inseminaci. Tato varianta metody vykazovala vyšší míru přežití (92 %) a další optimalizace, včetně enukleace a kultivace embryí, vedoucí ke zlepšení vývoje do stádia blastocysty (Hyslop et al. 2016). Analýza aneuploidie navíc ukázala, že ePNT nezvyšuje riziko chromozomálních abnormalit ve srovnání s kontrolními blastocystami. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že použití vitrifikovaných oocytů pacientky (namísto oocytů dárkyně) vedlo k nižšímu přenosu mitochondriální DNA. U 79 % blastocyst byla hladina heteroplasmie nižší než 2 %, přičemž žádná blastocysta nepřesáhla 5% podíl mutantní mitochondriální DNA (Hyslop et al. 2016). Na základě předvedených výsledků lze konstatovat, že ePNT představuje slibný přístup ke snížení rizika přenosu mitochondriálních chorob, ačkoliv nulová heteroplasmie zatím není zaručena. Použití vitrifikovaných oocytů pacientek se jeví jako efektivní strategie pro další minimalizaci přenosu mitochondriální DNA.

Načasování provedení PNT se ukázalo jako klíčový faktor ovlivňující vývojový potenciál embrya. Tento závěr potvrdili Znachorova et al. (2024) ve své studii pomocí myších oocytů. Ve svém výzkumu porovnávali dvě vývojové fáze, G1 a G2 fázi prvního embryonálního cyklu. Výsledky ukázaly, že čím dál se samčí prvojádro nachází a funguje v abnormálním prostředí, tím nižší je jeho vývojový potenciál.

#### **4.3.2.3 PŘENOS PRVOJADER NA ZLEPŠENÍ KVALITY OOCYTŮ A ZYGOT**

Při zlepšování kvality oocytů a embryonálního vývoje savců byla ve studii Tang et al. (2020) hodnocena účinnost dvou metod, PNT a ST. Autoři použili dva myší modely, jeden s neplodností způsobenou vyšším věkem a druhý s ranou zástavou embryonálního vývoje. Tyto stavy představují běžné komplikace při léčbě neplodnosti metodou IVF. V pokusu byly použity myši ve věkovém rozdílu 56-70 týdnů, což odpovídá přibližně 36-45 letům u člověka (Dutta a Sengupta 2016). Výsledky této studie naznačují, že vývojový potenciál embryí se zlepšil po PNT nebo ST a tedy že tyto metody jsou účinné pro zlepšení kvality oocytů (Tang et al. 2020). Obě metody představují slibné strategie pro pacienty potýkající se s neplodností spojenou s věkem a s časnou zástavou embryonálního vývoje. Zajímavým zjištěním také ještě bylo, že metoda PNT vykazovala o něco vyšší účinnost, pravděpodobně díky jadernému obalu, který chrání prvojádra. Několik studií potvrdilo, že s věkem matky dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, což negativně ovlivňuje vývoj embrya (Wilding et al. 2001). Kromě toho byly mitochondriální dysfunkce u stárnoucích oocytů spojeny s chybami při meióze, které jsou typické pro neplodnost spojenou s věkem (Eichenlaub-Ritter 1996; Hamatani et al. 2004). Data ukázala, že MII oocyty starších myší vykazovaly signifikantně nižší mitochondriální membránový potenciál než oocyty mladých jedinců. Tento stav byl dále doprovázen poruchami dělicího vřeténka a

nesprávným rozdělením chromozomů. Výsledky tedy potvrzují, že pokročilý věk matky může být spojen s mitochondriálními dysfunkcemi, které mohou negativně ovlivnit úspěšnost embryonálního vývoje.

### 4.3.3 VÝHODY A NEVÝHODY PŘENOSU PRVOJADER

Studie naznačují, že tato metoda má potenciál v prevenci přenosu mitochondriálních nemocí. Nicméně bychom měli zvážit výhody a nevýhody, které nám tato metoda může přinést. Mezi hlavní obavy patří etické otázky.

V porovnání s metodou ST má PNT dvě hlavní výhody. Zaprvé, prvojádra jsou obklopena jaderným obalem, což zajišťuje lepší ochranu před poškozením nebo ztrátou chromozomů. Zadruhé, prvojádra jsou snadněji viditelná pod inverzním mikroskopem, zatímco k vizualizaci dělicího vřeténka je potřeba speciálního zařízení používající polarizované světlo. Nevýhodou je ale větší velikost prvojader, což komplikuje manipulaci a může vést k přenosu většího množství cytoplazmy, která může potenciálně obsahovat mutovanou mitochondriální DNA (Craven et al. 2010; Sathananthan a Trounson 2000). Větší velikost prvojader může také způsobit buněčné a jaderné poškození, což může ovlivnit vývoj embrya. Existuje tedy riziko mechanického poškození buněk nebo nežádoucích genetických změn. Eticky problematickým aspektem je fakt, že k PNT jsou potřeba dvě embrya, přičemž postižená zygota je po izolaci prvojader zničena. To může být nepřijatelné pro ty, kteří považují zygotu za počátek lidského života. Jednoznačným přínosem, který ale tato metoda nabízí, je možnost zachování genetické informace obou rodičů a zároveň nahrazení mutované mitochondriální DNA zdravou dárkyně. Zárok probíhá až po oplození, čímž se eliminuje potřeba dlouhodobé kultivace oocytů *in vitro*, to zpravidla vede ke sníženému vývoji embryí po oplození. Z dlouhodobého hlediska může být metoda PNT přínosná pro rodiny zatížené mitochondriálními chorobami a nabízí alternativu tam, kde jsou standardní postupy léčby limitované. Představené výsledky jsou opravdu slibné. Je ale nezbytné pokračovat ve výzkumu zaměřeném na optimalizaci postupů, hodnocení zdravotních dopadů a zajištění její bezpečnosti.

## 5 ZÁVĚR

V této práci jsou shrnuty současné poznatky o technikách přenosu genetického materiálu, konkrétně o přenosu zárodečných váčků, dělicího vřetenka a prvojader, které představují klíčové metody v moderní reprodukční medicíně a vývojové biologie. Zmíněné technologie nám umožňují interakce mezi cytoplazmou a jádrem, přičemž každá z těchto metod se využívá pro odlišná vývojová stadia oocytů nebo zygot. Z toho vyplývají rozdílná technická provedení a různá míra klinického uplatnění. Ačkoliv každá z těchto metod využívá jiná vývojová stadia oocytů nebo zygot, jejich společným cílem je přenos genetického materiálu za účelem prevence mitochondriálních chorob a současné zvýšení šance na úspěšné těhotenství.

Na rozdíl od metody GVT, která je stále experimentální, jsou metody ST a PNT povolené ve Velké Británii a kvůli absenci speciální legislativy i v Mexiku nebo na Ukrajině. To umožňuje širokou klinickou aplikaci těchto metod. To vedlo k významnému snížení míry přenesené mutované mitochondriální DNA a následnému narození živých a zdravých potomků, stejně jako k řešení problémů spojených s předčasným zastavení embryonálního vývoje. Možná optimalizace podmínek týkající se in vitro zrání by mohla výrazně zlepšit klinické použití metody GVT. Nicméně i přes slibné výsledky těchto metod je nutné zohlednit i etické a technické výzvy, které je provázejí. Mezi hlavní obavy stále patří manipulace s lidskými zygotami a dlouhodobé zdravotní důsledky potomků. Kromě etických aspektů hrají velkou roli i právní otázky týkající se identity dítěte, právní odpovědnosti rodičů a dědičnosti. Můžeme pouze doufat, že v průběhu následujících let budou tyto metody stále častěji aplikovány v klinické praxi nejen ve Velké Británii, ale i v dalších zemích, čímž se jejich klinické uplatnění rozšíří.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

\*označuje sekundární citace

- Ann Jordan, Mary, Douglas Thrower, a Leslie Wilson. 1992. „Effects of Vinblastine, Podophyllotoxin and Nocodazole on Mitotic Spindles : Implications for the Role of Microtubule Dynamics in Mitosis". *Journal of Cell Science* 102 (3): 401–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.102.3.401>.
- Balayla, Jacques, Laurent Azoulay, Jonathan Assayag, Alice Benjamin, a Haim Abenheim. 2011. „Effect of Maternal Age on the Risk of Stillbirth: A Population-Based Cohort Study on 37 Million Births in the United States". *American Journal of Perinatology* 28 (08): 643–50. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1276739>.
- Blerkom, Jonathan Van, Patrick W Davis, a John Lee. b.r. „ATP Content of Human Oocytes and Developmental Potential and Outcome after In-Vitro Fertilization and Embryo Transfer".
- Burke, Brian, a Jan Ellenberg. 2002. „Remodelling the Walls of the Nucleus". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (7): 487–97. <https://doi.org/10.1038/nrm860>.
- Carter, S. B. 1967. „Effects of Cytochalasins on Mammalian Cells". *Nature* 213 (5073): 261–64. <https://doi.org/10.1038/213261a0>.
- Costa-Borges, Nuno, Eros Nikitos, Katharina Späth, Irene Miguel-Escalada, Hong Ma, Klaus Rink, Clement Coudereau, et al. 2023. „First Pilot Study of Maternal Spindle Transfer for the Treatment of Repeated in Vitro Fertilization Failures in Couples with Idiopathic Infertility". *Fertility and Sterility* 119 (6): 964–73. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.02.008>.
- Costa-Borges, Nuno, Katharina Spath, Irene Miguel-Escalada, Enric Mestres, Rosa Balmaseda, Anna Serafin, Maria Garcia-Jimenez, et al. 2020. „Maternal Spindle Transfer Overcomes Embryo Developmental Arrest Caused by Ooplasmic Defects in Mice". *eLife* 9 (duben):e48591. <https://doi.org/10.7554/eLife.48591>.
- Craven, Lyndsey, Mao-Xing Tang, Gráinne S. Gorman, Petra De Sutter, a Björn Heindryckx. 2017. „Novel Reproductive Technologies to Prevent Mitochondrial Disease". *Human Reproduction Update* 23 (5): 501–19. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx018>.
- Craven, Lyndsey, Helen A. Tuppen, Gareth D. Greggains, Stephen J. Harbottle, Julie L. Murphy, Lynsey M. Cree, Alison P. Murdoch, et al. 2010. „Pronuclear Transfer in Human Embryos to Prevent Transmission of Mitochondrial DNA Disease". *Nature* 465 (7294): 82–85. <https://doi.org/10.1038/nature08958>.
- Cui, Long-Bo, Xiu-Ying Huang, a Fang-Zhen Sun. 2005. „Transfer of Germinal Vesicle to Ooplasm of Young Mice Could Not Rescue Ageing-Associated Chromosome Misalignment in Meiosis of Oocytes from Aged Mice". *Human Reproduction* 20 (6): 1624–31. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh826>.

- \*Ducreux, Bastien, Lucile Ferreux, Catherine Patrat, a Patricia Fauque. 2023. „Overview of Gene Expression Dynamics during Human Oogenesis/Folliculogenesis". *International Journal of Molecular Sciences* 25 (1): 33. <https://doi.org/10.3390/ijms25010033>.
- \*Dunlop, Cheryl E., a Richard A. Anderson. 2014. „The Regulation and Assessment of Follicular Growth". *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 74 (sup244): 13–17. <https://doi.org/10.3109/00365513.2014.936674>.
- Dutta, Sulagna, a Pallav Sengupta. 2016. „Men and Mice: Relating Their Ages". *Life Sciences* 152 (květen):244–48. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>.
- Eichenlaub-Ritter, Ursula. 1996. „Parental Age-Related Aneuploidy in Human Germ Cells and Offspring: A Story of Past and Present". *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28 (3): 211–36. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)28:3<211::AID-EM6>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)28:3<211::AID-EM6>3.0.CO;2-G).
- Fretts, Ruth C, a Robert H Usher. 1995. „Increased Maternal Age and the Risk of Fetal Death".
- Fu, Ying-Hui, Derek P.A. Kuhl, Antonio Pizzuti, Maura Pieretti, James S. Sutcliffe, Stephen Richards, Annemieke J.M.H. Verkert, et al. 1991. „Variation of the CGG Repeat at the Fragile X Site Results in Genetic Instability: Resolution of the Sherman Paradox". *Cell* 67 (6): 1047–58. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90283-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90283-5).
- Fulka, Helena, Atsuo Ogura, Pasqualino Loi, a Josef Fulka, Jr. 2019. „Dissecting the Role of the Germinal Vesicle Nuclear Envelope and Soluble Content in the Process of Somatic Cell Remodelling and Reprogramming". *Journal of Reproduction and Development* 65 (5): 433–41. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-017>.
- Gao, Shaorong, Bianca Gasparrini, Michelle McGarry, Tricia Ferrier, Judy Fletcher, Linda Harkness, Paul De Sousa, a Ian Wilmut. 2002. „Germinal Vesicle Material Is Essential for Nucleus Remodeling after Nuclear Transfer1". *Biology of Reproduction* 67 (3): 928–34. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004606>.
- Gaulden, Mary Esther. 1992. „Maternal Age Effect: The Enigma of Down Syndrome and Other Trisomic Conditions". *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 296 (1–2): 69–88. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(92\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0165-1110(92)90033-6).
- Gorman, Gráinne S., Andrew M. Schaefer, Yi Ng, Nicholas Gomez, Emma L. Blakely, Charlotte L. Alston, Catherine Feeney, et al. 2015. „Prevalence of Nuclear and Mitochondrial DNA Mutations Related to Adult Mitochondrial Disease". *Annals of Neurology* 77 (5): 753–59. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>.
- Hagemann, L. J., F. L. Hillery-Weinhold, M. L. Leibfried Rutledge, a N. L. First. 1995. „Activation of Murine Oocytes with Ca<sup>2+</sup> Ionophore and Cycloheximide". *Journal of Experimental Zoology* 271 (1): 57–61. <https://doi.org/10.1002/jez.1402710107>.
- Hamatani, Toshio, Geppino Falco, Mark G. Carter, Hidenori Akutsu, Carole A. Stagg, Alexei A. Sharov, Dawood B. Dudekula, Vincent VanBuren, a Minoru S.H. Ko. 2004. „Age-Associated

- Alteration of Gene Expression Patterns in Mouse Oocytes". *Human Molecular Genetics* 13 (19): 2263–78. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh241>.
- Hassold, T., a D. Chiu. 1985. „Maternal Age-Specific Rates of Numerical Chromosome Abnormalities with Special Reference to Trisomy". *Human Genetics* 70 (1): 11–17. <https://doi.org/10.1007/BF00389450>.
- Herbert, Mary, a Doug Turnbull. 2018. „Progress in Mitochondrial Replacement Therapies". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (2): 71–72. <https://doi.org/10.1038/nrm.2018.3>.
- Hyslop, Louise A., Paul Blakeley, Lyndsey Craven, Jessica Richardson, Norah M. E. Fogarty, Elpida Fragouli, Mahdi Lamb, et al. 2016. „Towards Clinical Application of Pronuclear Transfer to Prevent Mitochondrial DNA Disease". *Nature* 534 (7607): 383–86. <https://doi.org/10.1038/nature18303>.
- Igarashi, Hideki, Toshifumi Takahashi, Hiroyuki Abe, Hiroshi Nakano, Osamu Nakajima, a Satoru Nagase. 2016. „Poor Embryo Development in Post-Ovulatory *in Vivo* -Aged Mouse Oocytes Is Associated with Mitochondrial Dysfunction, but Mitochondrial Transfer from Somatic Cells Is Not Sufficient for Rejuvenation". *Human Reproduction* 31 (10): 2331–38. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew203>.
- Infertility Prevalence Estimates, 1990-2021*. 2023. 1st ed. Geneva: World Health Organization.
- Ishii, Tetsuya, a Yuri Hibino. 2018. „Mitochondrial Manipulation in Fertility Clinics: Regulation and Responsibility". *Reproductive Biomedicine & Society Online* 5 (duben):93–109. <https://doi.org/10.1016/j.rbms.2018.01.002>.
- John, Philip, a F. R. Whatley. 1975. „Paracoccus Denitrificans and the Evolutionary Origin of the Mitochondrion". *Nature* 254 (5500): 495–98. <https://doi.org/10.1038/254495a0>.
- Jones, Keith T. 2008. „Meiosis in Oocytes: Predisposition to Aneuploidy and Its Increased Incidence with Age". *Human Reproduction Update* 14 (2): 143–58. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm043>.
- Liu, Hui, Chia-Woei Wang, James A. Grifo, Lewis C. Krey, a John Zhang. 1999. „Reconstruction of Mouse Oocytes by Germinal Vesicle Transfer: Maturity of Host Oocyte Cytoplasm Determines Meiosis". *Human Reproduction* 14 (9): 2357–61. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.9.2357>.
- Liu, Lin, a David L. Keefe. 2004. „Nuclear Origin of Aging-Associated Meiotic Defects in Senescence-Accelerated Mice1". *Biology of Reproduction* 71 (5): 1724–29. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028985>.
- Lutjen, Peter, Alan Trounson, John Leeton, Jock Findlay, Carl Wood, a Peter Renou. 1984. „The Establishment and Maintenance of Pregnancy Using *In Vitro* Fertilization and Embryo Donation in a Patient with Primary Ovarian Failure". *Nature* 307 (5947): 174–75. <https://doi.org/10.1038/307174a0>.

- McFarland, Robert, Robert W Taylor, a Douglass M Turnbull. 2002. „The Neurology of Mitochondrial DNA Disease". *The Lancet Neurology* 1 (6): 343–51. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(02\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00159-X).
- McGrath, James, a Davor Solter. 1983. „Nuclear Transplantation in the Mouse Embryo by Microsurgery and Cell Fusion". *Science* 220 (4603): 1300–1302. <https://doi.org/10.1126/science.6857250>.
- Mitalipov, Shoukhrat, a Don P. Wolf. 2014. „Clinical and Ethical Implications of Mitochondrial Gene Transfer". *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25 (1): 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.001>.
- Navot, D., R.A. Bergh, M.A. Williams, G.J. Garrisi, I. Guzman, B. Sandler, a L. Grunfeld. 1991. „Poor Oocyte Quality Rather than Implantation Failure as a Cause of Age-Related Decline in Female Fertility". *The Lancet* 337 (8754): 1375–77. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93060-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93060-M).
- \*Nesbit, Carleigh B., Jia Huang, Bhuchitra Singh, Jacqueline Y. Maher, Lisa M. Pastore, a James Segars. 2020. „New Perspectives on the Genetic Causes of Diminished Ovarian Reserve and Opportunities for Genetic Screening: Systematic Review and Meta-Analysis". *F&S Reviews* 1 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.xfnr.2020.06.001>.
- \*Neupane, Jitesh, Mado Vandewoestyne, Sabitri Ghimire, Yuechao Lu, Chen Qian, Rudy Van Coster, Jan Gerris, et al. 2014. „Assessment of Nuclear Transfer Techniques to Prevent the Transmission of Heritable Mitochondrial Disorders without Compromising Embryonic Development Competence in Mice". *Mitochondrion* 18 (září):27–33. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.09.003>.
- Newson, Ainsley J, Stephen Wilkinson, a Anthony Wrigley. 2016. „Ethical and Legal Issues in Mitochondrial Transfer". *EMBO Molecular Medicine* 8 (6): 589–91. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606281>.
- Oberlé, I., F. Rousseau, D. Heitz, C. Kretz, D. Devys, A. Hanauer, J. Boué, M. F. Bertheas, a J. L. Mandel. 1991. „Instability of a 550-Base Pair DNA Segment and Abnormal Methylation in Fragile X Syndrome". *Science* 252 (5009): 1097–1102. <https://doi.org/10.1126/science.252.5009.1097>.
- Pacchierotti, F., I.-D. Adler, U. Eichenlaub-Ritter, a J.B. Mailhes. 2007. „Gender Effects on the Incidence of Aneuploidy in Mammalian Germ Cells". *Environmental Research* 104 (1): 46–69. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.12.001>.
- Palacios-González, César. 2017. „Are There Moral Differences between Maternal Spindle Transfer and Pronuclear Transfer?" *Medicine, Health Care and Philosophy* 20 (4): 503–11. <https://doi.org/10.1007/s11019-017-9772-3>.

- Palacios-González, César, a María De Jesús Medina-Arellano. 2017. „Mitochondrial Replacement Techniques and Mexico’s Rule of Law: On the Legality of the First Maternal Spindle Transfer Case". *Journal of Law and the Biosciences* 4 (1): 50–69. <https://doi.org/10.1093/jlb/lsw065>.
- Pan, Hua, Pengpeng Ma, Wenting Zhu, a Richard M. Schultz. 2008. „Age-Associated Increase in Aneuploidy and Changes in Gene Expression in Mouse Eggs". *Developmental Biology* 316 (2): 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.048>.
- Petitti, Diana B. 1987. „The Epidemiology of Fetal Death": *Clinical Obstetrics and Gynecology* 30 (2): 253–58. <https://doi.org/10.1097/00003081-198706000-00004>.
- Pieretti, Maura, Fuping Zhang, Ying-Hui Fu, Stephen T. Warren, Ben A. Oostra, C. Thomas Caskey, a David L. Nelson. 1991. „Absence of Expression of the FMR-1 Gene in Fragile X Syndrome". *Cell* 66 (4): 817–22. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90125-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90125-I).
- Reznichenko, As, C Huyser, a Ms Pepper. 2016. „Mitochondrial Transfer: Implications for Assisted Reproductive Technologies". *Applied & Translational Genomics* 11 (prosinec):40–47. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2016.10.001>.
- Sathananthan, A.H., a A.O. Trounson. 2000. „Mitochondrial Morphology during Preimplantational Human Embryogenesis". *Human Reproduction* 15 (suppl 2): 148–59. [https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl\\_2.148](https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.148).
- Sauer, Mark V., Richard J. Paulson, a Rogerio A. Lobo. 1990. „A Preliminary Report on Oocyte Donation Extending Reproductive Potential to Women over 40". *New England Journal of Medicine* 323 (17): 1157–60. <https://doi.org/10.1056/NEJM199010253231702>.
- \*Sendra, Luis, Alfredo García-Mares, María José Herrero, a Salvador F. Aliño. 2021. „Mitochondrial DNA Replacement Techniques to Prevent Human Mitochondrial Diseases". *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2): 551. <https://doi.org/10.3390/ijms22020551>.
- Sills, Eric Scott, Michael M. Alper, a Anthony P.H. Walsh. 2009. „Ovarian Reserve Screening in Infertility: Practical Applications and Theoretical Directions for Research". *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 146 (1): 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.05.008>.
- Smith, G. F., M. A. C. Ridler, a Janet A. Fauch. 1967. „Action of Cytochalasin B on Cultured Human Lymphocytes". *Nature* 216 (5120): 1134–35. <https://doi.org/10.1038/2161134a0>.
- Stossel, T P. 1978. „Contractile Proteins in Cell Structure and Function". *Annual Review of Medicine* 29 (1): 427–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.29.020178.002235>.
- Tachibana, Masahito, Michelle Sparman, Hathaithip Sritanaudomchai, Hong Ma, Lisa Clepper, Joy Woodward, Ying Li, Cathy Ramsey, Olena Kolotushkina, a Shoukhrat Mitalipov. 2009. „Mitochondrial Gene Replacement in Primate Offspring and Embryonic Stem Cells". *Nature* 461 (7262): 367–72. <https://doi.org/10.1038/nature08368>.

- \*Tal, Reshef, a David B. Seifer. 2013. „Potential Mechanisms for Racial and Ethnic Differences in Antimüllerian Hormone and Ovarian Reserve". *International Journal of Endocrinology* 2013 (1): 818912. <https://doi.org/10.1155/2013/818912>.
- . 2017. „Ovarian Reserve Testing: A User’s Guide". *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 217 (2): 129–40. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.02.027>.
- Tang, M, M Popovic, P Stamatiadis, M Van Der Jeught, R Van Coster, D Deforce, P De Sutter, et al. 2020. „Germline Nuclear Transfer in Mice May Rescue Poor Embryo Development Associated with Advanced Maternal Age and Early Embryo Arrest". *Human Reproduction* 35 (7): 1562–77. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa112>.
- „Testing and Interpreting Measures of Ovarian Reserve: A Committee Opinion". 2015. *Fertility and Sterility* 103 (3): e9–17. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.093>.
- The Guideline Group on Unexplained Infertility, D Romualdi, B Ata, S Bhattacharya, E Bosch, M Costello, K Gersak, et al. 2023. „Evidence-Based Guideline: Unexplained Infertility". *Human Reproduction* 38 (10): 1881–90. <https://doi.org/10.1093/humrep/dead150>.
- Wilding, Martin, Brian Dale, Marcella Marino, Loredana Di Matteo, Carlo Alviggi, Maria Laura Pisaturo, Luisa Lombardi, a Giuseppe De Placido. 2001. „Mitochondrial Aggregation Patterns and Activity in Human Oocytes and Preimplantation Embryos". *Human Reproduction* 16 (5): 909–17. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.909>.
- „World’s First Baby with DNA of Three Parents Was Born in Ukraine | Nadiya Family Planning Clinic". b.r. Viděno 26. duben 2025. <https://nadiya.clinic/info/worlds-first-baby-with-dna-of-three-parents-was-born-in-ukraine/>.
- \*Yabuuchi, Akiko, Zeki Beyhan, Noriko Kagawa, Chiemi Mori, Kenji Ezoe, Keiichi Kato, Fumihito Aono, Yuji Takehara, a Osamu Kato. 2012. „Prevention of Mitochondrial Disease Inheritance by Assisted Reproductive Technologies: Prospects and Challenges". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820 (5): 637–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.014>.
- Yang, Huixia, Thomas Kolben, Sarah Meister, Corinna Paul, Julia Van Dorp, Sibel Eren, Christina Kuhn, et al. 2021. „Factors Influencing the In Vitro Maturation (IVM) of Human Oocyte". *Biomedicines* 9 (12): 1904. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121904>.
- Zegers-Hochschild, Fernando, G. David Adamson, Silke Dyer, Catherine Racowsky, Jacques De Mouzon, Rebecca Sokol, Laura Rienzi, et al. 2017. „The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017". *Fertility and Sterility* 108 (3): 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>.
- \*Zhang, John. 2015. „Revisiting Germinal Vesicle Transfer as a Treatment for Aneuploidy in Infertile Women with Diminished Ovarian Reserve". *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32 (2): 313–17. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0400-3>.

- Zhang, John, a Hui Liu. 2015. „Cytoplasm Replacement Following Germinal Vesicle Transfer Restores Meiotic Maturation and Spindle Assembly in Meiotically Arrested Oocytes". *Reproductive BioMedicine Online* 31 (1): 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.03.012>.
- Zhang, John, Hui Liu, Shiyu Luo, Zhuo Lu, Alejandro Chávez-Badiola, Zitao Liu, Mingxue Yang, et al. 2017. „Live Birth Derived from Oocyte Spindle Transfer to Prevent Mitochondrial Disease". *Reproductive BioMedicine Online* 34 (4): 361–68. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.013>.
- Zhang, John, Chia-Woei Wang, Lewis Krey, Hui Liu, Li Meng, Anna Blaszczyk, Alexis Adler, a Jamie Grifo. 1999. „In Vitro Maturation of Human Preovulatory Oocytes Reconstructed by Germinal Vesicle Transfer". *Fertility and Sterility* 71 (4): 726–31. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00549-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00549-4).
- Zhang, John, Guanglun Zhuang, Yong Zeng, Jamie Grifo, Carlo Acosta, Yimin Shu, a Hui Liu. 2016. „Pregnancy Derived from Human Zygote Pronuclear Transfer in a Patient Who Had Arrested Embryos after IVF". *Reproductive BioMedicine Online* 33 (4): 529–33. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.07.008>.
- Zickler, D., a N. Kleckner. 1998. „THE LEPTOTENE-ZYGOTENE TRANSITION OF MEIOSIS". *Annual Review of Genetics* 32 (1): 619–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.619>.
- Znachorova, Tereza, Nataliia Dudko, Hao Ming, Zongliang Jiang, a Helena Fulka. 2024. „The Timing of Pronuclear Transfer Critically Affects the Developmental Competence and Quality of Embryos". *Molecular Human Reproduction* 30 (7): gaae024. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaae024>.