

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Barbora Stryková

Charakteristika, příčiny a léčba neplodnosti
Characteristics, causes and treatment of infertility

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Praha, 2019

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Biology

Branch of study: Biology



Barbora Stryková

Characteristics, causes and treatment of infertility
Charakteristika, příčiny a léčba neplodnosti

Bachelor's thesis

Supervisor: RNDr. Kateřina Hortová, PhD

Prague, 2019

Abstrakt

Neplodnost postihuje celosvětově cca 9 % párů, a to buď z příčiny na straně ženy, muže, nebo obou z nich, případně není žádná příčina identifikována a neplodnost je klasifikována jako idiopatická. Rizikových faktorů pro vznik neplodnosti je mnoho, např. stárnutí, infekce pohlavních cest, vystavení cytostatikům apod., ale často se setkáváme i s příčinami genetickými.

Práce se zabývá jednotlivými vyšetřeními u neplodných pacientů a způsoby léčby konkrétních poruch. V práci je také přiblíženo používání technologií asistované reprodukce (ART) u zvířat, kde se využívá ve šlechtitelství, nebo k zefektivnění chovu díky zkráceným generačním dobám a produkci kvalitního potomstva. ART je používáno i k produkci transgenních či klonovaných zvířat, využívaných k základnímu výzkumu a pro farmaceutické účely.

Práce poukazuje na výhody, ale i nevýhody jednotlivých technik, a jejich možná rizika. Ukazuje, že jedním z největších nebezpečí je nadužívání léčby pomocí intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI). V práci jsou ukázána nejběžnější rizika vyplývající z této léčby. Práce si rovněž klade za cíl ukázat, jak může ART být využito v oboru reprodukční biologie a chovatelství.

Klíčová slova

Neplodnost, asistovaná reprodukce, *in vitro* fertilizace, intracytoplazmatická injekce spermie, intrauterinní inseminace, člověk, myš, dobytek, prase, modelové organismy.

Abstract

Infertility affects worldwide around 9 % of couples, either on the side of a women, a men or both of them, or if there is no cause of infertility identified the infertility is classified as idiopathic. There are many causes of infertility, such as aging, infection of genitals, exposure to cytosttics, etc., but we also often encounter genetic causes.

The work deals with individual examinations in infertile patiens and methods of treatment of particular disorders. In the thesis is also brought closer usage of assisted reproduction technologies (ART),where is used for breeding, or to make farming more efficient due to shorter generational times and production of a large number of quality offspring. ART is also used to produce transgenic or cloned animals used for basal research but also for pharmaceutical purposes.

The work points out advantages and disadvantages of individual techniques and shows their possible risks. It shows, that one of the greatest dangers is overuse of intracytoplasmic sperm injection treatment. The most common risks arising from this treatment are shown in the work. Furthermore, the work aims to show how ART can help in understanding reproductive biology and how it helps in breeding.

Keywords

Infertility, assisted reproduction, *in vitro* fertilization, intra-cytoplasmic sperm injection, intra-uterine insemination, human, mouse, cattle, swine, model organisms.

Čestné prohlášení

Tuto práci jsem vypracovala samostatně, veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Text této práce jsem nepoužila k získání titulu na stejné ani jiné škole. Prohlašuji, že elektronická verze práce je shodná s verzí tištěnou.

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Kateřině Hortové, PhD. za to, že mi ochotně pomáhala, radila a vedla mou práci a byla velmi vstřícná. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při tvorbě této práce.

Obsah

Úvod.....	1
1 Charakteristika a příčiny neplodnosti	2
Rizikové faktory pro vznik neplodnosti	2
Mužská neplodnost.....	3
Ženská neplodnost.....	5
2 Léčba neplodnosti	6
Vyšetření před provedením asistované reprodukce.....	6
Anamnéza.....	6
Další vyšetření muže	6
Další vyšetření ženy	9
Farmakoterapie	9
Metody asistované reprodukce	11
Umělá inseminace (AI)	11
<i>In vitro</i> fertilizace a embryotransfer (IVF ET).....	12
Intracytoplasmická injekce spermií (ICSI).....	13
Kryokonzervace gamet a embryí.....	14
Darování gamet a embryí.....	15
3 Výsledky AR	16
4 Translační výzkum: Aplikace výsledků základního výzkumu v Asistované reprodukci .	16
Aplikace myšního modelu	16
Aplikace potkaního modelu.....	18
Aplikace dalších modelů	18
5 Asistovaná reprodukce u hospodářských zvířat	19
Koně.....	19
Skot.....	20
Arteficiální inseminace	20
Embryotransfer.....	21
MOET.....	21
<i>In vitro</i> produkce embryí (IVP)	22
Dělení embryí, bisekce a reprodukční klonování.....	24
Závěr.....	25
Seznam použitých zkratk.....	26

Seznam použitých zdrojů	28
-------------------------------	----

Úvod

Tato práce se zabývá možnými příčinami neplodnosti, ať už na genetické, či na jiné úrovni. Snaží se popsat jednotlivé metody asistované reprodukce a uvádí, v jakých případech jsou jednotlivé metody indikovány, kontraindikovány a jaká jsou jejich možná rizika. Dále seznamuje s vybranými zvířecími modely a některými studii, které napomohly při objasňování nejasností v reprodukční biologii. Nakonec ukazuje, jaké je využití těchto technologií v hospodářství.

Neplodnost vykazuje v posledních dekádách vzrůstající trend. (Boivin, Bunting, Collins, & Nygren, 2007) V současné době stále více párů odkládá těhotenství a tím si snižuje šanci na otěhotnění. S věkem se plodnost velice rychle snižuje, hlavně u žen, kdy hrozí vyčerpání ovariální rezervy. Věk má ale vliv samozřejmě i na plodnost mužskou, kdy se s věkem snižuje kvalita spermatu, kvůli hromadění drobných poškození. Neplodnost může mít souvislosti i se špatnou životosprávou, kdy například obezita má také za následek snižování plodnosti u žen, či při promiskuitě hrozí infekce pohlavního traktu a následná neprůchodnost pohlavních cest (u obou pohlaví).

Techniky asistované reprodukce jsou využívány přes 30 let. Prvnímu dítěti počatému metodou IVF je dnes 35 let. Přestože jsou tyto technologie jedny z nejčastěji využívaných léčebných metod, nikdy neprošly fází testovací studie, a tak se o jejich případných rizicích můžeme dozvědět pouze z retrospektivních studií. (Alukal & Lamb, 2008) Jak bude níže uvedeno, rizika v používání asistované reprodukce se skutečně vyskytují, nemají však až tak vysoké zastoupení. Většinou je prognóza léčby neplodnosti velice dobrá a neplodným párům po celém světě dopomáhá k početí.

Techniky asistované reprodukce jsou velice užitečné také na poli hospodářství, kde pomáhají zlepšovat efektivitu chovu.

1 Charakteristika a příčiny neplodnosti

(Zegers-Hochschild et al., 2009) definuje neplodnost jako neschopnost páru otěhotnět alespoň po jednom roce nechráněného pohlavního styku. Podle výzkumu (Boivin, Bunting, Collins, & Nygren, 2007), je ve světě průměrně 9 % neplodných párů, z nichž 56 % vyhledá lékařskou pomoc. Vyšší procento neplodnosti bylo obecně zjištěno ve vyspělejších zemích.

Pár může být neplodný z příčin neplodnosti muže, ženy, nebo obou partnerů. Někdy je při vyšetření zjištěn dobrý zdravotní stav u obou partnerů, ti však přesto nemohu otěhotnět. V tom případě se jedná o idiopatickou neplodnost.

(Řežábek, 2014) definuje asistovanou reprodukci (AR) jako medicínský obor, který pracuje s gametami a embryi mimo tělo ženy za účelem oplodnění.

AR se v ČR provádí jen u neplodného páru (muže a ženy) a tento pár nemusí být oddán. Léčba je pojišťovny hrazena pacientkám do 39 let, léčebný cyklus musí být ukončen před 39. narozeninami pacientky. Zdravotní pojišťovny hradí 3 – 4 léčebné cykly, přičemž čtyři hradí pouze v případě, že při každém cyklu bylo přenášeno pouze jedno embryo. Pár si může léčbu platit sám, přesto však věk ženy nesmí přesáhnout 48 let a 364 dní. V legislativě umělého oplodnění nacházíme i podmínky pro věk dárce, přičemž žena dárkyně musí být starší 18 let a její věk nesmí přesáhnout 35 let, u muže je horní hranice posunuta k 40 letům. Dárcovství je oboustranně anonymní. Umělé oplodnění nesmí být použito pro volbu pohlaví dítěte, s výjimkou toho, pokud se tímto dá předejít vážnému genetickému onemocnění s vazbou na pohlaví. (“Zákony ČR onLine - úplná znění zákonů, přehled právních předpisů platných v ČR a zákony zdarma.” n.d.) Prognóza léčby neplodnosti je velmi dobrá, většina neplodných párů (cca 90 %) nakonec otěhotní. (Řežábek, 2014)

Rizikové faktory pro vznik neplodnosti

Hlavním rizikem je stárnutí, a to hlavně u žen. Otěhotnění by se nemělo odkládat za hranici 35 let, kdy plodnost ženy výrazně klesá. Dále se během života mohou kumulovat drobné vady, které mohou plodnost snižovat, toto riziko roste s věkem obou partnerů.

Rizikovým faktorem u žen může být obezita. Dále např. u mužů může docházet k vyššímu riziku neplodnosti při vystavení dichlorbrompropanu. U obou pohlaví hrozí riziko při vystavení radiaci a cytostatikům a také při promiskuitě. Pokud je vystavení cytostatikům plánované (léčba rakoviny, autoimunitního onemocnění...) lze zamrazit spermie, nebo v případě ženy embrya. Při promiskuitě hrozí infekce a uzávěr pohlavních cest. (Řežábek, 2014)

Mužská neplodnost

Mužská neplodnost je způsobena jedním, nebo kombinací těchto faktorů: nízká koncentrace spermií, chabá motilita, nebo abnormální morfologie spermií. V méně vyspělých zemích je procento neplodných mužů vyšší, příčinou neplodnosti ale v tomto případě bývají většinou následky infekčních onemocnění. (Kumar & Singh, 2015, podle Sciara, 1994)

Zdravý muž (normospermik) musí splňovat jisté normy, od kterých se pak dále odvíjí klasifikace jednotlivých poruch. Při normospermii má muž ejakulát o objemu 1,4 – 1,7 ml, přičemž koncentrace spermií dosahuje 12 – 16 milionů spermií na ml. Normospermik má alespoň 3 – 4 % spermií s normální morfologií (oválná hlavička, přičemž 40 – 70 % hlavičky zaujímá akrozom. Střední část by měla být zhruba stejně dlouhá jako hlavička, bičík by měl být desetkrát delší). Vitálních spermií by mělo být alespoň 55 % a alespoň 31 % progresivně se pohybujících. (Cooper et al., 2010)

Nepřítomnost spermií v ejakulátu se nazývá azospermie. Můžeme ji dělit na obstrukční a neobstrukční. Azospermii lze zjistit z centrifugovaného ejakulátu. Dále se provádějí fyzická a hormonální vyšetření, která nám mohou objasnit, zda se jedná o obstrukční, nebo neobstrukční azospermii. Jistý výsledek získáme biopsií varlat. Dále se dělí obstrukční azospermie na dědičnou (idiopatická epididymální obstrukce, vrozená absence *vas deferens*, mikrodelece na Y chromozomu) a získanou (post infekční uzávěr *ductus deferens*, vasktomie, úrazy reprodukčního traktu). Získaná obstrukční azospermie se dá řešit chirurgickým zákrokem, nebo lze odebrat spermie pro asistovanou reprodukci (fertilizace *in vitro* nebo intracytoplazmatická injekce spermie). (Schlegel, 2004). Ukázalo se, že s neplodností u mužů s neobstrukční azospermii souvisí i selhání při opravách DNA. Takto defektní gen může být předán na potomka, což má za následek různé malignity (jako je např. retinoblastom). Tyto případy ale nejsou příliš běžné. (Alukal & Lamb, 2008)

U neplodných mužů může být dále také diagnostikována oligozoospermie, tedy nízký počet spermií v ejakulátu. Ta může být také způsobena mikrolecemi na Y chromozomu, ale i například zánětem. V případě oligozoospermie v důsledku zánětu jsou pro léčbu používány fytochemické a nutriční léky, u kterých ale není přesvědčivě prokázána účinnost. Oligozoospermie je často doprovázena i špatnou pohyblivostí (motilitou) a morfologií (např. oligoastenoospermie, což je kombinace malého množství spermií a jejich pomalého pohybu, nebo například oligoastenoteratoospermie (OAT), což je kombinace nízkého počtu, nízké pohyblivosti a špatné morfologie.) OAT je nejčastějším fenotypem u subfertilních mužů, jednotlivé konkrétní formy se ale u pacientů liší a proto je těžké určit

konkrétní genetickou příčinu. Výrazné zvýšení počtu spermií i lepší motility bylo docíleno podáním prednisonu nemocným pacientům. (Milardi et al., 2017) (Coutton, Escoffier, Martinez, Arnoult, & Ray, 2015, podle Boivin, 2007)

Dalším důvodem neplodnosti je také asterozoospermie, což je nízká motilita spermií. Může docházet i k případům, kdy jsou všechny spermie zcela nepohyblivé. Tento případ nastává u 1 z 5000 mužů. V takovýchto případech je prognóza plodnosti špatná i u ICSI. Asterozoospermie se rozlišuje na úplnou a absolutní, přičemž při úplné jsme ještě schopni nalézt motilní spermie. Absolutní asterozoospermie má často souvislost s metabolickými poruchami, nekrozoospermii (mrtvé spermie v ejakulátu), ultrastrukturálními vadami na bičíku nebo může být idiopatická (Ortega et al., 2011, podle Afzelius, 1981)

Teratozoospermie je špatná morfologie spermií, kdy má pacient v ejakulátu méně než 4 % normálních spermií. Příčina teratozoospermie bývá často genetická, ale často i idiopatická. (Cooper et al., 2010) Jedním z případů je např. makrocefalie spermie, což je způsobeno homozygotní mutací aurora kinázy C (protein esenciální pro v buněčné proliferaci). Dalším genem, jehož defekty způsobují teratozoospermii je např. dpy-19-like 2 (DPY_{19L2}) účastníci se na vývoji spermatid. U globozoospermie (spermie s kulatou hlavičkou) nejsou přítomny akrozomální struktury, což znemožňuje vazbu na *zona pellucida* na vajíčku. Z 81 procent je globozoospermie způsobena delecemi na dpy-19-like 2. Mutace v genu DNAH₁ (dynein axonemal heavy chain 1) způsobují morfologické změny na bičíku (jedná se hlavně o závady na centrálním páru mikrotubulů). (Coutton et al., 2015, podle Boivin, 2007)

Deformace bičíku mohou mít často za následek až asterozoospermii. Tyto poruchy zaujímají širokou morfologickou škálu (mohou mít často vliv i na morfologii hlavičky, případně mohou být i příčinou Oligozoospermie. Mezi defekty bičíku řadíme jeho absenci, krátkou délku, zahnutost, nepravidelnost nebo i vlnitost. Tyto poruchy souhrnně označujeme jako MMAF (multiple morphological abnormalities of the flagella). Mutace v genu sulate carrier family 26 nebo v septinu 12 (proteiny účastníci se formování septinového prstence) u asterozoospermiků a teratozoospermiků má za následek zahnutý bičík a kulatou hlavičku s defektním akrozomem. (Coutton et al., 2015, podle Boivin, 2007)

Ostatní deformace se řadí mezi tzv. čisté teratozoospermie (tzn., mají 100 % defektních spermií v ejakulátu a tyto spermie mají všechny stejnou morfologickou abnormalitu) a řadí se sem globozoospermie, vícebičíkaté spermie s velkou hlavičkou a spermie bez hlavičky. Přítomnost vícebičíkatých spermií s velkou hlavičkou se také jinak nazývá makrozoospermie, nebo také makrocefalie. Tyto spermie se dále také vyznačují abnormální střední částí a akrozomem. U mužů s makrozoospermii byl zjištěn častější výskyt

aneuploidií a polyploidií. Souvisí to s chromozomální non-disjunkcí, případně s problémy s cytokinezí v obou mitotických děleních, což dále také způsobuje fenotyp velké hlavičky s větším počtem bičíků. Tyto abnormality při dělení jsou způsobeny homozygotní delecí v AURKC. (Coutton et al., 2015, podle Boivin, 2007)

Ženská neplodnost

V mezinárodní klasifikaci nemocí nalezneme ženskou neplodnost pod kódem N97. je zde rozdělena na několik skupin. Odlišujeme ženskou neplodnost spojenou s anovulací, tubárního původu (kdy může jít o blokádu, neprůchodnost, nebo stenózu), děložního původu, cervikálního původu, spojenou s mužskými faktory, jiného původu či nespecifikovanou. (Nezánětlivá onemocnění ženského pohlavního ústrojí (N80–N98),” n.d.)

Vrozená neplodnost ženy je např. syndrom 45X0, androgenní insenzivita, neléčený adrenogenitální syndrom (AGS), nebo parciální AGS zjištěný až v dospělosti. Morfologicky podmíněná neplodnost je způsobena pozánětlivým uzávěrem obou vejcovodů, periovariální adhezí, endometriálním polypem, submukózním myomem, nebo nepřítomností endometria. Hormonálně zapříčiněnou neplodností je pak například způsobená poruchou cykličnosti ovariální funkce, hyperandrogenním syndromem, anovulací, thyreopatií, nebo hyperprolaktinemií. Imunologicky zapříčiněné neplodnosti jsou endometrióza, antispermická neplodnost, anebo přítomnost protilátek proti *zona pellucida*. Infekční neplodnost může být způsobena toxoplazmózou, boreliózou, nebo tuberkulózou. Mentální anorexie a pseudocycosis mohou také způsobit neplodnost, jedná se pak o psychogenní neplodnost. (Řežábek, 2014)

U žen také časem dochází k vyčerpání ovariální zásoby. Během stárnutí se počet a kvalita oocytů snižuje, až dosáhne stavu, kdy je ovariální zásoba vyčerpána a žena už nemůže otěhotnět (souvisí s tím i zastavení cyklických hormonálních procesů a ženy kolem 50 let yvstupují do menopauzy). Ženy odkládající těhotenství za hranici 30, někdy až 40 let, tvoří velké procento neplodných žen. Do třiceti let věku má žena při pravidelném nechráněném pohlavním styku se zdravým partnerem šanci na otěhotnění 20 – 25 %. S věkem se tato pravděpodobnost snižuje. Ve třiceti pěti letech je tato šance už asi jen 15 %. K vyčerpání ovarii může dojít i kvůli vystavení radiaci, toxicky, nebo opakovanou chirurgickou resekci ovarii. (Řežábek, 2014) (Amanvermez & Tosun, 2016 podle Grynnerup, 2012)

2 Léčba neplodnosti

Vyšetření před provedením asistované reprodukce

Vždy je potřeba vyšetřit oba partnery. Jako první provádíme anamnézu, která nám poskytne podnět pro další vyšetření. Následně vyšetřujeme spermioqram. Pak vyšetříme pacientku gynekologicky, poté ultrazvukem a nakonec stanovíme u ženy hladiny hormonů. Podle nálezů pak pokračujeme s dalšími vyšetřeními, případně zahájíme léčbu. (Řežábek, 2014)

|Anamnéza

Nejprve zjistíme, jak dlouho pár nemůže otěhotnět. Ptáme se, jak často u nich dochází k pohlavnímu styku. Dále zjišťujeme, zda u páru nedochází k problémům jako je např. předčasná ejakulace, anejakulace, vaginismus apod. U ženy zjišťujeme délku a pravidelnost menstruačního cyklu. Dotazujeme se také na váhu ženy (obezita a anorexie mohou být důvodem neplodnosti, případně nepravidelnosti menstruačního cyklu). Dále zjišťujeme, jaké závažné choroby partneri prodělali a také jaké podstoupili operace (u mužů nás např. zajímá léčba kryptorchismu). Dotazujeme se na předchozí těhotenství a jejich výsledek (i s jinými partnery). Je nutné se dotazovat na užívané léky (dříve i nyní). Nakonec je nutné si vyžádat zprávy o provedených vyšetřeních a výkonech, jako např. již proběhlé cykly IVF. (Manuel Montoya, Bernal, & Borrero, n.d.)

|Další vyšetření muže

U mužů zjišťujeme hladiny hormonů, pohlavně přenosné nemoci a vyšetřujeme spermioqram. Na odběr spermatu se muž dostaví po dvou až sedmi dnech sexuální abstinence. Ve speciálně k tomu uzpůsobené místnosti pacient získá masturbací ejakulát, ze kterého následně provádíme spermioqram. Ejakulát se odebírá do sterilní Petriho misky, nebo do speciálního plastového kelímku s víčkem. V nádobách nesmí zůstat zbytky dezinfekce, aby nedošlo k poškození spermií. Po odběru se ejakulát nechává 30 minut zkapalnit. Následně se zjišťuje objem, případně hmotnost ejakulátu. Sperma se musí dobře promíchat. Dále se zjišťuje pH pomocí lakmusového papírku. 10 µl spermatu nanese do Maklerovy komůrky, díky čemuž můžeme určit počet spermií v nativním spermatu (jde jen o přibližný počet, spermie se při počítání pohybují). Určujeme také motilitu spermií. Odlišujeme tři druhy motility a to progresivně pohyblivé spermie (PR), neprogresivně pohyblivé spermie (NP) a nepohyblivé spermie (IM). Do spermioqramu udáváme počty spermií z jednotlivých kategorií

v procentech. Pokračujeme se zkoumáním morfologie spermií. Hledáme případné odchylky od ideálního vzhledu, jako jsou například dvojité bičíky, dvě hlavičky a další deformace. Nakonec sledujeme přítomnost leukocytů, bakterií a prvků v ejakulátu. (Cooper et al., 2010)

Možné výsledky spermiogramu podle norem WHO:

- Normozoospermie - počet, morfologie i motilita se pohybují v normálních hodnotách (WHO parametry zdravého muže jsou následující: objem ejakulátu činí 1,4 – 1,7 ml, koncentrace spermií je 12 – 16 milionů na ml, celkový počet spermií v ejakulátu by měl tedy být mezi 33 – 46 miliony, minimálně 3 – 4 % by měla být morfologicky v normě, tzn. bez zdvojených částí těla apod. V ejakulátu by mělo být alespoň 55 – 63 % živých spermií, dále alespoň 31 – 34 % spermií by mělo být progresivně motilních. (Cooper et al., 2010))
- Oligozoospermie – snížený počet spermií
- Astenoospermie – pomalý pohyb spermií
- Teratoospermie – vyšší počet patologických forem
- Azoospermie – nepřítomnost spermií v ejakulátu (aspermie znamená nepřítomnost ejakulátu vůbec)

Jednotlivé poruchy se mohou vzájemně kombinovat. Při horších výsledcích spermiogramu je lepší provádět ICSI. Při hodnotách alespoň na dolní hranici normy je vysoká pravděpodobnost na oplodnění oocytů klasickou metodou IVF. Pokud v ejakulátu nenalezneme spermie, můžeme se pokusit je získat chirurgicky (TESE – testicular sperm extraction, MESA – micro epididymal sperm aspiration). Při koncentraci spermií pod 1×10^6 na ml ejakulátu, odesíláme muže na genetické vyšetření. Vyšetření spermiogramu provádíme alespoň dvakrát po 3 – 4 týdnech. (Cooper et al., 2010)

U muže také zjišťujeme protilátky proti spermiím. Protilátky proti spermiím ovlivňují plodnost několika způsoby. Ve spermatu mohou způsobovat shlukování neboli aglutinaci, zabraňují migraci spermií v cervikálním hlenu tím, že se svými Fc fragmenty (krystalizujícími částmi těžkých řetězců) vážou na glykoproteinové micely cervikálního hlenu. Dále také vyvolávají leukocytózu (zvýšený počet leukocytů v krvi) a rozpad spermií v děloze nebo ve vejcovodu. Pokud jsou spermie protilátkami obaleny, nemohou pronikat přes *zona pellucida* do vajíčka. Protilátky se mohou vyskytovat ve spermatu, ale také v séru. Je nutné také zjistit, o jaký typ se jedná. To se provádí aglutinačními testy (TAT – tray agglutination test), kdy podle typu aglutinace lze rozeznat konkrétní typ protilátky. Pokud se jedná o IgG protilátky, spermie se aglutinují bičíky k sobě. Pokud se váží hlavičkami, jedná se IgM. IgG protilátky

proti spermiiám jsou nejčastějším případem. Produkce protilátek proti spermiiám u mužů má několik důvodů (oslabení bariéry v krevním zásobování varlat, obstrukce chámovodu a semenných váčků, autoimunitní onemocnění nebo *diabetes mellitus*), nejčastěji ale důvod není známý. (Arora, Sudhan, & Sharma, 1999) Druhým prováděným testem je smíšená antiglobulinová reakce (MAR – mixed antiglobulin reaction). Jedná se o reakci ve směsi čerstvého neošetřeného spermatu, latexových částechek s navázanými lidskými IgG protilátkami. Přidávají se ještě monospecifické anti-humánní IgG, navázané na latexových částechkách. Mezi anti-IgG a IgG dojde k aglutinaci. Pozitivita testu se hodnotí podle procenta spermii obalených latexovými partikulami a procenta aglutinovaných spermii. (Lahteenmaki, 1993) Podle studie (Stedronska & Hendry, 1983) se ukázalo, že by měl být MAR standardní součástí testování spermatu. Ukázalo se, že v testech MAR se dají nalézt protilátky i u cca 10 % mužů, kteří by mohli být jinak klasifikováni jako zdraví, jelikož mají normální hodnoty spermioqramu. To ukazuje i studie (Lahteenmaki, 1993), kde byly korelovány výsledky jednotlivých prováděných testů, a bylo prokázáno, že testy MAR nejlépe vyhodnocují míru šance na oplodnění.

Jedním z dalších prováděných vyšetření je postkoitální test (PCT), kdy se zkoumá schopnost pohybu spermii v cervikálním hlenu. Nechráněný pohlavní styk by měl proběhnout 1 – 2 dny před ovulací, večer před PCT. Při vyšetření se ještě dotazujeme na konkrétní čas styku. Odebírá se 1 ml hlenu. I jedna pohyblivá spermie se považuje za pozitivní výsledek. (Řežábek, 2014) PCT je široce využíváný, přestože nemá vysokou diagnostickou hodnotu (na čemž se obecně vědci shodují). Pokud se test jeví jako negativní, je započata léčba, která se na jednotlivých pracovištích různí, a nebývá příliš efektivní. Centra většinou přistupují k léčbě pomocí IUI (intrauterinní inseminace) spolu s ovariální stimulací, přestože nikdy nebyla prokázána specifická efektivita pro tento případ. (Oei et al., 1998, podle Oei, 1995) V tomto testu je dále problém v nesjednocené metodologii, různí se definice normality a s tím je spojen problém s reprodukovatelností. (Oei, Helmerhorst, & Keirse, 1995) PCT pacienty spíše zatěžuje, zvyšuje množství testů, které musí centrum vyhodnocovat a přitom nepřináší kladné výsledky ve zvyšování pravděpodobnosti otěhotnění. Byla porovnána kumulativní úspěšnost léčby (vyjadřující pravděpodobnost otěhotnět za několik léčebných cyklů) jednotlivých pracovišť, kde se rutinně provádí PCT jako součást vyšetření, s centry kde se k PCT přistupuje až v případech nutnosti a výsledky se nijak výrazně nelišily. (Oei et al., 1998, podle Oei, 1995)

Další vyšetření ženy

Zjišťujeme ovariální rezervu ženy, tím že zavedeme vaginální ultrazvukovou sondu a spočítáme viditelné folikuly. Ve dvaceti letech je typicky viditelných dvacet folikulů v každém ovariu. Ve třiceti letech vidíme cca deset folikulů. Tento počet nazýváme Antral Follicle Count (AFC). Další možností zjištění ovariální rezervy je stanovení antimüllerického hormonu (AMH), který se tvoří v malých (1 – 4 mm) folikulech. Vysoká hladina AMH odpovídá velkému množství folikulů. Stanovení ovariální rezervy je spolehlivější pomocí AFC. Vyšetření AFC i AMH se může provádět kdykoliv během cyklu.

Dále stanovujeme hladinu bazálních hormonů (FSH, LH) v séru. Vyšetření se provádí na začátku cyklu, nejlépe druhý den od začátku menstruačního krvácení. Hodnoty se s věkem zvyšují, s hodnotou FSH nad 12 IU/l je otěhotnění už velmi obtížné. U žen se syndromem polycystických ovarií (PCO) je AFC dost vysoké. Tyto ženy nemají problém s dozráváním folikulů do stadia sekundárního folikulu, další fáze již ale neprobíhá.

Je nutné také zjistit, zda žena nemá přítomné protilátky proti *zona pellucida*. Pokud jsou tyto protilátky přítomny, je možno tento stav léčit kortikoidy. Přítomnost protilátek však ještě nemusí mít souvislost s neplodností. Dále je možno tento stav řešit mimotělním oplodněním (IVF, často i ICSI).

V první polovině cyklu lze ještě provádět laparoskopii. Provádí se v začátku cyklu proto, abychom měli jistotu, že žena ještě není těhotná. Laparoskopie se využívá pro kontrolu morfologie malé pánve a průchodnosti vejcovodů. Během laparoskopie lze také odstranit ložiska endometriózy. Lze také ověřit podezření na saktosalpinx (SS, vejcovod naplněný tekutinou). SS výrazně snižuje šanci na otěhotnění i po IVF. SS se odstraňuje operačně (salpingektomie) (Manuel Montoya et al., n.d.).

Kuldoskopie, jinak též transvaginální hydrolaparoskopie, je vyšetření orgánů malé pánve prováděné optikou. Tubární neprůchodnost se řeší pomocí IVF. Hysteroskopie odhaluje vrozené vývojové vady dělohy, případně polypy v děloze. (Řežábek, 2014)

Farmakoterapie

Farmakoterapie se využívá pro zvýšení počtu zralých oocytů, zvýšení kvality oocytů, přesné načasování dozrání a odběru oocytů a pro přípravu děložní sliznice na implantaci embrya.

Pravděpodobnost otěhotnění odpovídá počtu oocytů a embryí. Používá se tedy ovariální hyperstimulace (COH). Pokud chceme léčit neplodnost metodou IUI, nebo jen

zvýšíme počet zralých oocytů pro samovolný pohlavní styk, necháváme dozrát 2 – 4 oocyty. Pro léčbu pomocí IVF necháváme dozrát cca 10 oocytů. Stimulace ovaríí není rizikem pro vyčerpání ovariální zásoby.

Antiestrogeny zvyšují hladinu FSH v krvi už od začátku cyklu a tím zvyšují počet zralých folikulů. Aktivní látkou je klomifen. Antiestrogeny jsou antagonisté estrogenů a omezují jejich negativní zpětnou vazbu tím, že se naváží na jejich receptory v hypofýze. Antiestrogeny se nepoužívají, pokud chceme provádět IVF, stimulují k dozrání asi jen 2 – 4 folikuly. Využívají se hlavně při provedení IUI.

Folitropin je vyrobený FSH. Vyrábí se z moči menopauzálních žen, anebo v bioreaktorech na tkáňových kulturách. Podává se intramuskulárně, nebo intravenózně od začátku cyklu a tím zvyšují počet zralých folikulů.

Menotropin je hMG (humánní menopauzální gonadotropin). Jedná se o kombinaci FSH a LH v poměru 1 : 1. Menotropin a Folitropin fungují obdobně. Menotropin se nepoužívá u žen s PCO, protože ty mají samy vysoké hladiny LH.

Antagonisté GnRH jsou syntetická analoga GnRH. Jsou používána k útlumu tvorby FSH a LH, tím že se v hypofýze naváží na receptory pro přirozené GnRH. Tím zvyšují kvalitu oocytů. Používají se od sedmého dne cyklu, protože v této době hrozí riziko předčasného vzestupu LH. Podávat se přestanou až tehdy, když uměle vyvoláme ovulaci (podáním hCG). Pokud LH předčasně vzroste, folikuly dozrají nestejně, folikuly nepukají současně a hladina progesteronu se předčasně zvyšuje (posunuje se implantační okno endometria). Tím, že pík LH indukujeme uměle, můžeme naplánovat odběr oocytů na přesný čas.

Dále se pro zvýšení kvality oocytů využívají agonisté GnRH. Stejně jako antagonisté GnRH, jsou i agonisté GnRH syntetická analoga přirozeného GnRH, jsou ale mnohem účinnější. O jejich podání dojde k flare-up fenoménu, což je výrazný vzestup sekrece FSH a LH. Za cca 3 až 5 dní dojde k zastavení produkce FSH a LH. Podávají se intravenózně, nebo subkutánně. Agonisty GnRH lze tak využít k indukci ovulace, jejich použití snižuje riziko hyperstimulačního ovariálního syndromu, ale také snižuje kvalitu endometria. Je tu tedy menší šance k implantaci následně přeneseného embrya, proto se používají hlavně u dárkyň oocytů. Agonisty GnRH není možno využít, pokud byly použity již k blokování hypofýzy, využívají se jen, pokud byla hypofýza blokována antagonisty GnRH.

K indukci ovulace se dále využívá chorionový gonadotropin (hCG), který se vyrábí z moči těhotných žen, nebo v bioreaktorech Tyto léky vyvolávají pík produkce LH a ovulace nastává 38 – 40 hodin po tomto píku.

Pro přípravu endometria na implantaci embrya se využívají estrogen a gestageny. Z gestagenů je to progesteron. (Řežábek, 2014)

Metody asistované reprodukce

Přestože jsou ART využívána přes 30 let, stále nejsou dopodrobna prozkoumána všechna možná rizika s nimi spojená. ART jsou široce využívanou metodou, přesto nikdy neprošli testovací fází. Pomocí retrospektivních studií jsou objevována různá rizika. Největším a nejčastějším problémem jsou vícečetná těhotenství, která mají souvislost s nižší porodní hmotností, předčasnými porody a nárůstem perinatální úmrtnosti. Tento problém se řeší pomocí SET (transfer jediného embrya). SET výrazně snižuje riziko vícečetného těhotenství a s tím spojených komplikací. Přesto však není všude využíván v běžné praxi (např. ve Spojených státech amerických). SET dále snižuje míru CP (mozkové obrny), což má dále za následek nižší míru neurologických a vývojových opoždění (u ICSI vzniklých dětí). (Alukal & Lamb, 2008)

Umělá inseminace (AI)

Jedná se o metodu zahrnující injekci vyčištěných spermií do pohlavního ústrojí ženy. Rozlišujeme AIH (spermie od partnera) a AID (spermie od dárce). Spermie mohou být vneseny do pochvy, na děložní hrdlo (ICI – intracervikální inseminace), nebo přímo do dělohy (v tomto případě se jedná o IUI - intrauterinní inseminaci). (Řežábek, 2014)

IUI je ale kontraindikováno u párů, kdy je u pacientky diagnostikována amenorea (absence menstruace), cervikální atrezie (neprůchodnost čípku), cervicitida (zánět děložního hrdla), endometritida (zánět dělohy) nebo obstrukce vejcovodů, nebo pokud je u muže diagnostikována vážná oligozoospermie. (Anonym ("Intrauterine insemination"), 2009)

Naopak indikace pro použití IUI je např. neplodnost kvůli cervikálnímu faktoru, mužskému faktoru, ovulační disfunkci, endometrióze, potížím při ejakulaci či při koitu (např. vaginismus), nebo pokud je neplodnost idiopatická.

Je problematické stanovit, jak přesně je IUI účinná (záleží na různých individuálních faktorech), uvádí se rozmezí od 5 – 70 %. (Duran, Morshedi, Kruger, & Oehninger, n.d., podle Cohlen, 200)

V případě, že důvodem neplodnosti je mužský faktor, případně je neplodnost idiopatická je IUI výnosnější metodou než ICI, a to jak v přirozených, tak i v cyklech se stimulovanými vaječníky. Na stimulaci vaječnicků (COH) se využívá klomifen citrát (CC) nebo gonadotropiny. V případě mužské subfertility se ukázalo, že COH pomocí CC nezvyšuje

míru fertility, ale použití gonadotropinů tuto pravděpodobnost zvyšuje (v porovnání s IUI v přirozených cyklech). U idiopatické neplodnosti obě účinné látky výrazně zvyšují šance na oplodnění. (Duran et al., n.d., podle Cohlen, 2000)

Pro úspěšné provedení IUI musíme znát čas ovulace. Tu můžeme načasovat podáváním hormonů, případně můžeme sledovat přirozený cyklus a ovulaci určit podle píku LH v moči pacientky. Tyto dva využívané způsoby nevykazují jinou míru následné fertility. Avšak výhodou uměle načasovaného cyklu je, že se dají jednotlivé procedury dopředu načasovat dle možností centra a pacientky a celý cyklus je lépe kontrolovatelný. (Duran et al., n.d., podle Cohlen, 2000)

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

Tato metoda zahrnuje odběr vajíček, následnou kultivaci se spermii a přenesení embrya do dělohy (lze vnést případně i více embryí). Indikací pro léčbu pomocí IVF ET je hlavně neprůchodnost vejcovodů. Je možné také místo kultivace spermií a vajíček pohromadě využít IVF/ICSI. (Řežábek, 2014)

Pomocí retrospektivních studií bylo ukázáno, že novorozencům počatých metodou IVF/ICSI hrozí největší riziko kongenitálních poruch (hlavně defekty močopohlavní soustavy) a epigenetických syndromů vzniklých častějším imprintingem (např. Beckwith-Wiedemannův a Angelmanův syndrom). Dále také častěji trpí kardiovaskulárními, gastrointestinálními defekty, nemocemi opěrné soustavy a chromozomovými abnormalitami. Při porovnání kohorty dětí počatých pomocí IVF/ICSI s dětmi z kontrolní skupiny (počatých spontánně), se ukázal signifikantní rozdíl v procentuálním zastoupení kongenitálních malformací (10 % u IVF/ICSI a 3,3 % u kontrolní skupiny). (Alukal & Lamb, 2008)

10 % jednočetných těhotenství z IVF prošlo syndromem mizejícího dvojčete. Toto procento je ještě vyšší u mnohočetných těhotenství. Tento syndrom je také dáván do souvislosti s CP a pro snížení tohoto rizika se doporučuje SET. (Alukal & Lamb, 2008)

Oocyty se odebírají transvaginální punkcí v celkové narkóze. Odebírají se cca 35 hodin po aplikaci hCG (proto se většinou hCG podává ve 20 – 21 hodin večer, odběr pak připadá na ráno 1,5 dní po aplikaci). (Řežábek, 2014). Embrya transferujeme 2. – 6. den po odběru. Kultivujeme-li je déle, můžeme pro transfer vybrat ta, která se nejlépe vyvíjí. Prodloužení kultivace je pro ně ale fyziologicky zatěžující. Embrya natáhneme do katetru a ta jsou pak pacientce aplikována do dělohy. Při zavádění nesmí dojít k poranění a krvácení, mohlo by dojít k obalení embrya sraženinou a to by se pak neuchytilo. Pacientka po embryotransferu nemusí zůstat na lůžku, na nidaci embrya to nemá žádný vliv. Po

embryotransferu se podává progesteron (1 až 2 týdny) pro podporu luteální fáze. (Řežábek, 2014)

Intracytoplasmická injekce spermie (ICSI)

Jde o injekci spermie do vajíčka. Tato metoda se využívá, jeli u muže diagnostikován nízký počet spermií. Jedná se o velmi úspěšnou metodu. Na injekci spermie se používá speciální skleněná kapilára, která je velikostí srovnatelná se spermií. Úkon se provádí pod mikroskopem, jako veškeré další mikromanipulace. ICSI může být součástí IVF. (Řežábek, 2014)

ICSI by se měla využívat jen v případech, kdy spermie sama není schopna proniknout do vajíčka. Např. spermie absolutních astenozoospermiků, které nejsou motilní. Nepohyblivost spermií obecně snižuje pravděpodobnost na oplodnění, tvoří se méně kvalitní embrya, ale přesto se pomocí ICSI dá dosáhnout fertilizace. (Ortega et al., 2011, podle Afzelius, 1981)

Dalším případem, kdy je vhodné přikročit k léčbě pomocí ICSI jsou pacienti trpící nekrozoospermii. V tomto případě je vhodné použít ICSI spolu s TESE (chirurgická extrakce spermatu z varlat). Tímto způsobem je možné získat viabilní (životaschopné) spermie i od pacienta, který má normálně v ejakulátu jen mrtvé spermie a zajistit tak možnost fertilizace. (Ortega et al., 2011, podle Afzelius, 1981)

Aby se u pacientů s astenozoospermii a nekrozoospermii zvýšila šance na úspěšné ICSI, provádí se testy, kterými se dají ze semene vybrat živé spermie. Každá tato technika má však svoje výhody a nevýhody: 1) HOST (test hypo-osmotického otoku), kde viabilní spermie s normální membránovou funkcí vykazují nabytí cytoplazmy a zvlnění bičíku díky přítoku vody do buňky při vystavení hypo-osmotického roztoku NaCl. Takto označené spermie neztrácejí svoji funkci a mohou být použity pro ICSI. 2) mechanická dotyková technika, kdy se mikropipetou zkouší pohyblivost bičíku, avšak spolehlivost výsledku spíše závisí na zkušenostech embryologa. 3) expozice spermií pentoxifylinu (PTX), což zvyšuje motilitu spermií zvýšením intracelulárního cAMP kde je úspěšnost nutné spermie po vystavení PTX očistit aby oocyty nepřišly do kontaktu s PTX. 4) LAISS (laserem asistované selekci imotilních spermií) se použije krátký laserový výboj v blízkosti špičky bičíku. Pokud se bičík několik sekund po záblesku začne pohybovat, spermie je živá a ihned se využije pro ICSI. Tato technika je ještě přesnější než HOST, ale o velmi nákladný test a tak se v současnosti ve většině center asistované reprodukce nevyužívá. (Ortega et al., 2011, podle Afzelius, 1981)

Přestože je léčba pomocí ICSI extrémně účinná pro řešení mužské neplodnosti, hrozí zde přenos cytogenetických poruch na potomky. Těmito často přenášenými defekty jsou například konstituční chromozomální abnormality. Často se také u potomků formují poruchy neplodnosti *de novo*. (Miharu, 2005). Je pro to několik alternativních vysvětlení: rozdílný mechanismus selekce spermie *in vivo* a *in vitro*, přenos pleiotropických genů způsobujících tělesné abnormality u potomků (které mohou současně zapříčínovat oligo- či azoospermii u otců), poruchy způsobené mikromanipulacemi při ICSI, *in vitro* hormonální prostředí, nebo bodové mutace způsobené různými stresory během procesu *in vitro*. (Alukal & Lamb, 2008)

Velice často se u mužských potomků vyskytuje hypospadiie (vrozený rozštěp močové trubice na spodní straně penisu). Bylo testováno 125 chlapců počatých pomocí ICSI a byla u nich naměřena výrazně nižší hladina testosteronu v porovnání se stejně starými přirozeně počatými chlapci. (Alukal & Lamb, 2008). Dále mívají neplodní muži 10 krát vyšší incidenci aneuploidií spermií než plodní muži. Potomci z ICSI mívají tyto komplikace také. (Alukal & Lamb, 2008). Jednou z genetických příčin neplodnosti je kongenitální bilaterální absence *vas deferens* (CBAVD) a tato porucha je předávána na potomstvo. Jedná se o genitální formu cystické fibrózy. Detekce této mutace je obtížná a v rutinních genetických testech se neprovádí. Vyšetření je povinné pouze u partnerek mužů s CBAVD. Mutace s vlivem na plodnost je delecí na Y chromozomu, což znamená, že všichni mužští potomci tohoto pacienta budou postiženi stejnou poruchou, budou také neplodní. (Alukal & Lamb, 2008)

Kryokonzervace gamet a embryí

Kryokonzervace se používá například, pokud nám při IVF vznikne více embryí, a my je nevyužijeme všechny během jednoho cyklu AR. Jsou využita při dalším cyklu. Hovoříme potom o kryoembryotransferu (KET), kdy rozmrazíme embrya z předchozího cyklu IVF a transferujeme je do dělohy matky. Je nutné synchronizovat stáří embrya a vývoj endometria. Pokud žena samovolně ovuluje, monitorujeme její cyklus, určíme den ovulace a provedeme KET v odpovídající den podle stáří embrya. V plně substituovaném cyklu sledujeme ultrazvukem výšku endometria. Při výšce nad 7 mm podáváme spolu s estrogeny gestageny a začínáme počítat čas. Embrya rozmrazíme tak, aby jejich stáří odpovídalo stáří endometria od přidání gestagenů. Pokud chceme aplikovat darovaná embrya, použijeme u příjemkyně také plně substituovaný cyklus. Těhotenství je do 6. týdne závislé na *corpus luteum*. To v plně substituovaném cyklu chybí, nesmí se tedy před 6. týdnem předčasně ukončit substituční léčba, došlo by k potracení embrya. Graviditu potvrdíme tak, že zjistíme hladinu hCG ve 2,5 – 3 týdnech od začátku podávání gestagenů (lze provést gravitest z moči). Za další týden lze

posoudit graviditu ultrazvukem. Vyjde-li gravitesta z moči negativní, substituční léčbu ještě neukončíme, ale provedeme ještě jedno stanovení hladiny hCG, tentokrát z krve. Až teprve po druhém negativním výsledku vysazujeme substituční léčbu (po 2 – 3 dnech nastupuje menstruace a hned v dalším cyklu může žena podstoupit další KET).

Dále lze kryokonzervaci využít při darování spermií, případně embryí. Buňky se zmrazují na -196 °C, jde o teplotu kapalného dusíku. Veškeré životní pochody buněk jsou při této teplotě pozastaveny. Buňky lze skladovat velmi dlouho. Jediné riziko je při rozmrazování, kdy může dojít k poškození buněk. To se řeší kryoprotektivním roztokem a postupným zvyšováním teplot při rozmrazování. Dalším problémem je kryokonzervace oocytů (často se v nich tvoří krystalky ledu). Ty se takto neuchovávají, ale bývají oplodněny a uchovávají se jako embrya. (Řežábek, 2014)

Pokud je u ženy diagnostikována rakovina, případně jiná nemoc léčená chemoterapií nebo radioterapií (což jsou léčby toxické pro gonády), zmrazují se embrya či oocyty (případně i ovariální tkáň se zárodečnými folikuly) pro zachování plodnosti. Uchovávání zárodečných váčků je bezpečnější, což se zmrazovacího procesu týče. Je ale nutné, aby folikuly podstoupily IVM (*in vitro* maturaci), což je pro ně fyziologicky stresující a může tak dojít ke ztrátám, takže výsledná míra fertilizace je na cca stejné úrovni jako při kryokonzervaci oocytů. V případě, že má žena stálého partnera a souhlasí s tím, že se pomocí jeho spermií vajíčka oplodní, kryokonzervují se embrya. Nemoci, u kterých se kryokonzervace doporučuje, jsou například: sarkom ve stehně, rakovina děložního čípku, akutní i chronická myeloidní leukemie, Shwachmanův-Diamondův syndrom (vrozená lipomatóza pankreatu), sarkom humeru, rakovina prsu, Hodgkinův lymfom a Bechetův syndrom. (Anderson, Wallace, & Baird, 2008, podle Howell, 1998) (Oktay & Oktem, 2010, Lee, 2006)

Darování gamet a embryí

Dárcem je podle zákona osoba stojící mimo neplodný pár. Dárci musí být mladší než 40 let a dárkyně mladší než 35 let. Dárci i dárkyně musí být vyšetřeni. Darované sperma se uchovává po odběru 6 měsíců zmrazené, a poté je dárci opět vyšetřeni na pohlavně přenosné choroby. Darované oocyty bývají hned využity k oplození a embryotransferu. Indikací pro přijetí gamet či embryí je nepřítomnost gamet u neplodného páru, závažné genetické nemoci, u kterých hrozí přenos na potomka, případně nekvalitní gamety. V ČR není možné přijetí spermií/embrya ze sociálních důvodů (jako je například neexistence partnera). (Řežábek, 2014)

Existuje také možnost výměny jader v darovaných oocytech. Některé nemoci (jako např. roztroušená skleróza, Parkinsonova choroba, deficience karnitinu) jsou dědičné pouze maternálně a to z DNA mitochondrií. V tomto případě je možné použít vajíčko dárkyně, vyjmout z něj jeho jádro a zaměnit ho za jádro z vajíčka matky. Cytoplazma ve vajíčku je tedy zdravá a takto dědičná choroba se nepřenesla na potomky. (Cyranoski, 2012)

3 Výsledky AR

Provádíme-li inseminaci, kdy žena není starší 35 let a u muže byla výsledkem spermogramu normospermie, je úspěšnost 10 – 15 % (při stimulaci růstu několika folikulů až 20 – 30 %).

Po IVF/ICSI je pravděpodobnost na otěhotnění 50 %, byla-li do dělohy transplantována 2 embrya. IR každého embrya je 30 %. (IR – implantation rate, je podíl gestačních váčků viditelných v děloze ultrazvukem a počtu transferovaných embryí.)

Dnes se u nás provádí často eSET (efektivní transfer jediného embrya), tak, že vybereme nejkvalitnější embryo, to může mít pravděpodobnost nidace až 60 %. Transferujeme-li jen jedno embryo, nevystavujeme ženu riziku mnohočetného těhotenství. Zbylá embrya zmrazujeme.

Kryokonzervace snižuje pravděpodobnost následného otěhotnění, po KET dvou embryí najednou je úspěšnost 30 – 40 %. (Řežábek, 2014)

4 Translační výzkum: Aplikace výsledků základního výzkumu v Asistované reprodukci

Aplikace myšího modelu

Z fyziologického hlediska je myší a lidské embryo velice podobné. Probíhají zde stejným způsobem děje jako je dělení, kompaktace, formace blastocysty a následná diferenciaci. Vzájemně se embrya obou druhů podobají i velikostí, myší embryo ve stádiu blastocysty dosahuje asi 70 μm , což odpovídá polovině lidské blastocysty. Na myším embryu se tedy dá ověřit funkčnost nových technik (např. mikromanipulačních) než je aplikujeme do lidské praxe. Myší embryo dosáhne velikosti plně vyvinuté blastocysty za 84 – 96 hodin, lidskému embryu to trvá ještě o 24 – 30 hodin déle, ale složením média se tento čas dá ovlivnit.

Byly provedeny pokusy k porovnání preimplantačních fází embryí myši a člověka a díky obdobným změnám v utilizaci substrátu *in vitro* bylo usouzeno, že lze myš použít jako

model pro studium lidské reprodukce. V celé preimplantační periodě (od oplodnění do stádia plně vyvinuté blastocysty) lze v obou případech používat stejné médium. Embrya obou druhů v první polovině časného vývoje před implantací závisí na pyruvátu, méně na laktátu a glutaminu a některých dalších neesenčních aminokyselin. Zdá se, že přítomnost anorganického fosfátu a glukózy má inhibiční účinek, ale samotná glukóza negativně nepůsobí. V druhé polovině preimplantační periody se ale spotřeba glukózy z média zvyšuje a je pro embrya potřebná. Embryím prospívá, pokud je v substrátu přítomno EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová a její soli). EDTA inhibuje enzym 3-fosfoglycerát kinázu, tím je inhibována glykolýza v období časného vývoje. Zvýšená glykolýza v tomto období zhoršuje vývin embrya.

V laboratořích bývají myší embrya využívána k testování způsobilosti pracoviště. (Quinn & Horstman, n.d.)

Díky tomu, že můžeme produkovat transgenní myši, došlo k velkému rozvoji znalostí v oblasti reprodukce. V myších můžeme na konkrétních genech způsobit mutace (např. delece a substituce).

Na myším modelu se často objasňují nejasnosti týkající se např. povrchových proteinů účastnících se kapacitace, akrozomální reakce apod. Tím že se dozvídáme nové informace ohledně těchto proteinů, je možné zjistit nové příčiny způsobující neplodnost. Jedním takovýmto proteinem s donedávna neznámou funkcí je protein glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza-spermatogenní (GAPDHS). Jedná se o glykolytický enzym produkující energii během spermatogeneze a motility spermie. Je lokalizován v apikální části hlavičky spermie. V myších byl GAPDHS identifikován pomocí protilátky Hs8 (monoklonální protilátka proti lidskému spermatu, která obdobně funguje i na myším modelu) díky imunofluorescenci. Dále také byla objevena jeho role jako vazebného proteinu při sekundární vazbě oocyty a spermie. (Margaryan et al., 2015)

Na myším modelu můžeme dále sledovat pomocí IVF a imunofluorescence některé důležité epigenetické procesy. Během embryogeneze dochází k výměně histonů za protaminy díky hyperacetylaci zbývajících histonů. Po fertilizaci, ještě před úplnou dekondenzací chromatinu dochází k acetylaci histonu H4 na lysinu 12 (H4K12ac) v paternálním chromatinu, což naznačuje jeho důležitou roli v časné embryogenezi. H4K12ac má aktivační vlastnosti a reguluje některé geny, které jsou pro časnou embryogenezi velmi podstatné. U neplodných mužů dochází ale ke snížené vazbě promotorů k H4K12ac, což souvisí s aberantní metylací, u nich přítomné. Myší model byl použit pro sledování přenosu H4K12ac

a dalších možných epigenetických projevů z paternálního chromatinu na embryo. (Vieweg et al., 2015)

V neposlední řadě se na myších zkoumá míra toxicity látek z prostředí, kterým je lidská populace vystavena. Byla mimo jiné např. prokázáno, že hyperandrogenismus (což simuluje v testech chronické vystavení dihydrotestosteronu - DHT) má souvislost s PCOS, což se projevuje jak reprodukčními tak i metabolickými problémy. Myším byla implantována peleta, ze které se postupně DHT uvolňoval. U těchto myší bylo po ukončení léčby nalezeno zvýšené procento atretických folikulů s cystami a obecně tyto myši vykazovaly vyšší tělesnou hmotnost. (van Houten et al., 2012)

Aplikace potkaního modelu

U potkanů se zkoumalo, jaký má vliv obezita na plodnost. Ukázalo se, že obézní potkani neměli sníženou míru fertility, ale měli mezi potomstvem vyšší procento obezity. Obezita interferuje s různými ovariálními funkcemi u žen. Toto se sice neprokázalo u potkanů, ale studie na nich může objasňovat patofyziologii obezity na reprodukci. (Campos, et al., 2008)

Na potkaním modelu byl dále prováděn výzkum syndromu testikulární dysgenese (TDS). Tato nemoc se formuje ještě v děloze, vyžaduje na zkoumání zvířecí model. Samci potkanů byly v děloze vystaveny dibutylftalátu (DBP) a bylo prokázáno, že tito samci trpěli častěji kryptorchismem, hypospadií, neplodností a abnormalitami varlat, stejně jako lidští pacienti. DBP snižuje hladinu produkovaného testosteronu a má vliv i na správnou formaci a funkci Sertolio buněk (což má vliv na budoucí spermiogenezi). (Fisher, Macpherson, Marchetti, & Sharpe, 2003)

V jiné studii byla u potkanů uměle navozená endometrióza, která byla následně léčena pomocí atorvastatinu (látka snižující koncentraci lipidů v krvi). Díky atorvastatinu se endometritické léze zmenšovali a byla také naměřena snížená produkce VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor, jehož nadměrná exprese souvisí s tvorbou endometriózy). Na základě této studie je možné zkoumat vliv statinů na endometriózu a objevit tak nový způsob léčby. (Oktem et al., 2007)

Aplikace dalších modelů

Reprodukční cyklus u klisen je velmi podobný cyklu žen, což jej činí výborným modelem. Na klisnách můžeme modelovat např. reprodukční stárnutí žen, zkoumat buněčnou komunikaci mezi matkou a embryem v raných fázích těhotenství a byla na nich také

prozkoumána imunologie těhotenství. Imunologické reakce vůči plodu se v tomto případě dobře dokumentují na modelu, kdy je matkou klisna a embryo je oslí. (Bähr & Wolf, 2012, podle Carter, 2007)

Krávy bývají využívány pro vizualizaci ovariálních funkcí a efektů stárnutí na plodnost. Dále lze pozorovat účinky infekcí na dělohu a stejně jako u koní lze pozorovat imunitní reakce vůči plodu. Také se zde zkoumá komunikace mezi plodem a matkou na molekulární úrovni a bylo tak objasněno několik abnormalit týkajících se ART. (Bähr & Wolf, 2012, podle Carter, 2007)

Ovce jsou vhodným modelem ovulace a problémů s ní spojených. Byly na nich například objasněny důvody předčasného selhání vaječníků nebo syndromu polycystických vaječníků. Také na nich můžeme pozorovat vliv výživy na ovulaci. (Bähr & Wolf, 2012, podle Carter, 2007)

Dalším modelem je např. morče, které se využívá jako model fetoplacentálního vývoje a porodu. Dále pak divocí křečci jsou pro reprodukční biologii zajímaví kvůli jejich hormonálnímu řízení (striktní řízení progesteronem, ale nikoliv estrogenem), extrémně krátké březosti a dále je na nich zkoumána implantace embryí. Historicky byl jako model pro embryologii a reprodukční biologii využíván králík. Na tomto modelu byly např. zjištěny teratogenní účinky thalidomidu, kdy tyto účinky nebyly patrné na hlodavčím modelu. Dnes se králík často využívá jako model pro IVF, ICSI, transgenezi a nukleární výměnu. Dalším hojně využívaným modelem je prase, které s člověkem sdílí fyziologické podobnosti. Vzhledem k tomu, že je poměrně časně pohlavně zralé, má krátké reprodukční intervaly a velký počet mláďat ve vrhu, je dobrým modelovým organismem. (Bähr & Wolf, 2012, podle Carter, 2007)

5 Asistovaná reprodukce u hospodářských zvířat

Koně

ART jsou u koní využívány hlavně ve šlechtitelství. Hřebcům je odebíráno sperma a to je využito pro AI. Pro kvalitní křížení je nutné vybrat hřebce s vysokou plodností a kvalitním potomstvem. To se ale zjišťuje buď retrospektivně tím, že je jeho sperma použito, a až dle výsledků inseminace je usuzováno na jeho kvalitu. Druhá možnost je samce fyzicky vyšetřit a jeho sperma otestovat v laboratoři ještě před použitím. Ne vždy se ale tímto postupem odhalí všechny problémy, které mohou ovlivňovat plodnost. Jedním z testů, který se ukázal být efektivní a nijak finančně náročný, je průtoková cytometrie, která umožňuje hodnotit

najednou několik faktorů na velkém množství spermatu ve vysoké rychlosti. (Colenbrander, Gadella, & Stout, 2003)

U koní je nejčastější ART embryotransfer. Tato metoda je však omezena, jelikož zatím není u klisen používána superovulace (na rozdíl od skotu, kde se jedná o součást nejdůležitější techniky). Oocyty se získávají z dominantních preovulačních folikulů, transvaginální punkcí, transabdominální punkcí, případně z vaječníků *post mortem*. Také se u koní stále neprovádí standardní IVF tak, jak bylo popsáno výše. Embrya jsou produkována pomocí ICSI, nebo jsou zralé oocyty přeneseny do vejcovodů klisen, které byly uměle inseminovány. U koní je pozorována poměrně velká úspěšnost u přenosu jader (klonování), ale tomto oboru se zatím věnuje jen několik málo laboratoří. (Hinrichs, 2013, podle Alm 1996)

Skot

U skotu se využívají techniky AR, jako jsou manipulace se spermatem pro arteficiální inseminaci, superovulace a embryotransfer (MOET), *in vitro* fertilizace a reprodukční klonování. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008) Metoda ICSI, která je velmi často užívána v lidské asistované reprodukci, je proveditelná i u skotu, přesto se ale velmi často nepoužívá. (Betteridge, 2006, podle Betteridge 2004)

Chov dobytka se významně podílí na ekonomické prosperitě vyspělých zemí. Pomocí ART můžeme chov zefektivnit, například díky zkráceným generačním intervalům, nebo šíření kvalitního genetického materiálu mezi kříženými populacemi zvířat. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

Světově je ročně produkováno díky superovulaci dobytka přes 500 000 embryí. Embrya jsou prodávána i mezi zeměmi. Asi 15 % těchto embryí vznikají pomocí IVF. (Mapletoft & Hasler, 2005) Komeracionalizace ET skotu začala v časných 70. letech 20. století, kdy veškeré zákroky (jako samotný transfer nebo odběr gamet) byly prováděny chirurgicky. Metoda AI je používána již déle. (Betteridge, 2006, podle Betteridge 2004)

Klonování dobytka díky přenosu jader (transgenní dobytek) se velmi dobře vyvíjí, přesto jsou to stále ještě hodně drahé metody, které využívá převážně farmaceutický průmysl. (Mapletoft & Hasler, 2005)

|Umělá inseminace

Během posledních 50 let rapidně vzrostlo využívání AI k reprodukci dobytka. K uchovávání a odebírání spermatu jsou využívány světově standardizované metody. Sperma je uchováváno v semenných sbírkách, které jsou přísně sterilně chráněna, aby nedošlo

k napadení spermatu patogeny. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

Sperma se skladuje buď hluboce zmrazené, v čerstvé tekuté formě, nebo zchladlé na -5 °C. Během kryokonzervace spermií pro AI, se lehce ztrácí fertilizační potenciál, ale přesto je to velmi úspěšná metoda. Šance na zabřeznutí po použití kryokonzervovaného spermatu je 60 %. Je-li samice oplodněna čerstvým spermatem, které bylo uchováváno v tekuté formě, je šance na zabřeznutí okolo 80 %. AI je také využívána ke šlechtění, řízení říje nebo klonování. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

|Embryotransfer

Během posledních 30 let došlo k výraznému zlepšení technik ET. Zvýšila se viabilita transferovaných embryí, kvalita zvířat vzniklých pomocí ET, atd. ET se nejvíce využívá a zároveň i rozvíjí v Severní Americe. (Betteridge, 2006, podle Betteridge 2004)

ET je používán více než metody AI. Materiál pro ET je lépe transportovatelný mezi státy a také snižuje riziko přenosu některých nemocí (embrya jsou lépe sterilně chráněna než uchovávané gamety). (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

Embrya bývají nejčastěji do dělohy transferována transcervikálně. Při této depozici bývá šance na zabřeznutí více než 60 %. Embrya nemusejí být transferována všechna najednou, ta co se netransferují, se uchovávají ve zmrzlém stavu, a to buď konvenční metodou, kdy se využívá pomalého zmrazování s použitím etylenglykolu, anebo pomocí vitrifikace, kdy se využívají vysoké koncentrace kryoprotektantů a embryo je ponořeno do tekutého dusíku. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

|MOET

MOET se využívá hlavně proto, že často nastává asynchronie mezi časem provádění AI a přítomností ovulace. To snižuje výrazně úspěšnost fertilizace. ET ale vyžaduje, aby cykly donora oocytů a příjemce embrya byly synchronizované, což má za následek transfer embrya v řádném termínu a zvýšení šance na uhníždění embrya a rozpoznání těhotenství recipientní samicí. Při použití transvaginální, ultrazvukem naváděné punkce folikulu pro získání oocytů (OPU – ovum-pick-up) se zvyšuje efektivita MOET. OPU lze provádět i u prepubertálních jalovic a březích samic. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

Při MOET je ovulace vyvolávána podáváním produktů hypofýzy (původem z prasat a ovcí), nebo podáním lidského menopauzálního gonadotropinu (hMG). Podávání hMG vyžaduje více injekcí za cyklus, ale snižuje rizika hyper-ovulace, selhání ovulace nebo vznik folikulárních cyst. Bylo by možné používat k vyvolání ovulace i rekombinantní FSH a LH, které jsou běžně využívány v lidské praxi, ale jsou velmi drahé a tak nejsou rutinně využívány u skotu. Většina hypofyzárních produktů, které jsou dostupné na trhu, mají různé poměry FSH a LH. Tyto extrakty jsou podávány v polovině luteální fáze dárce. Podávají se 4 – 5 dnů a zároveň je u dárce uměl indukovan nárůst luteálního hormonu. Následně je samice inseminována (dvakrát, v intervalu 12 hodin). Po 7 dnech je děloha propláchnuta, tím se získají embrya (průměrně 4 – 6 viabilních embryí). (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

Problémem ale je, že na MOET nereagují všechna zvířata jednotně, u některých vůbec nenastává superovulace, v některých případech jsou získána třeba jen 3 živá embrya a jen asi v jedné třetině nastane ideální případ, kdy zvíře superovuluje a produkuje větší množství embryí. Dalším problémem je, že při opakovaném vyvolávání superovulace, má léčba vliv na další plodnost. Mohou se vyvinout cystické syndromy a mohou ochabovat vaziva vemene. Dále, pokud je superovulace vyvolávána u mladých jalovic, vyvíjí se předčasně vemeno, a to může ohrožovat budoucnost dárce. (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

***In vitro* produkce embryí (IVP)**

IVP je novější a flexibilnější metoda než MOET. Je ale technicky náročnější, je zde zapotřebí lepší laboratorní dohled a vybavení. (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

IVP zahrnuje metody *in vitro* maturace (IVM), *in vitro* fertilizace (IVF) a *in vitro* kultivace (IVC). Tyto metody jsou světově využívány, přesto je jejich efektivita stále suboptimální, zvláště při používání OPU. Dalším problémem je nízký výtěžek oocytů na vaječník při běžném odběru, proto se využívá optimalizovaná metoda OPU. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008) OPU lze provádět pravidelně nebo sporadicky. Dokonce je možné takto vajíčka odebírat i dvakrát týdně. Výhodou OPU je také to, že není třeba dárce ošetřovat gonadotropiny, což je velmi výhodné hlavně u mladých jalovic, na které má ošetřování gonadotropiny neblahý vliv (otoky vemene, cystický syndrom vaječníků). Nevýhodou OPU je vyšší cena v porovnání s MOET, a je zde také zapotřebí speciálního laboratorního vybavení. (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

Lze provádět IVP i prepubertálních oocytů, zdá se to být výhodné pro zkrácení generačních intervalů, ale na druhou stranu se zde objevují etické problémy.

Suboptimalita IVP a zároveň vyšší cena způsobují řídkší využívání těchto metod u skotu. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

Pro IVF se využívají dva typy médií bez glukózy a s různou koncentrací heparinu. Oocyty se spolu se spermii inkubují 18 – 20 hodin. Po oplodnění jsou úplně odstraněny podpůrné buňky obklopující vajíčko a také přebývající spermie. Oplodněná vajíčka jsou přenesena do kultivačního systému.

Na úspěšnost IVF mají vliv dva faktory. Jedním je kvalita spermatu a druhým je stav kumulačního oocytového komplexu (COC), z tohoto důvodu je nutné standardizovat postupy pro kultivaci oocytů před IVF, aby se vždy získala homogenní populace oocytů, srovnatelná s dalšími vzorky. Oocyty s méně buňkami *cumulus oophorus*, jsou náchylnější na polyspermiu, ty které jich mají naopak mnoho, mají zase menší šanci na oplození. (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

Oplozené oocyty se kultivují až do stádia blastocysty. Na kultivaci se nejvíce využívá médium SOF-BSA a dále také CR1. Šestý den kultivace se hodnotí vývoj embryí. Zjišťuje se, zda u nich došlo ke kompaktaci, což je první diferenciační proces, ke kterému dochází. Ta embrya, u kterých ke kompaktaci došlo, jsou ta, která se pravděpodobně vyvíjejí normálně. Sedmý den by zdravá embrya vhodná pro přenos nebo pro zamrazení, měla být alespoň ve stádiu počáteční blastocysty. Hodně embryí dosáhne stádia blastocysty až 8. nebo 9. den. Tato embrya už ale nejsou považována za tak kvalitní, ty se nepoužívají pro zmrazení, mají menší šanci na přežití. Další možností je také kultivace embryí v oviduktu ovcí. (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

IVP se provádí i u jiných zvířat, jako třeba u ovcí a prasat. U ovcí jsou takto embrya produkována bez komplikací a často. Oocyty jsou zkoumány pod stereomikroskopem, poté jsou přeneseny do Petriho misky a zde jsou kultivovány. Po maturaci jsou oocyty oplodněny vyčištěnými spermii, zředěnými na koncentraci 1×10^6 spermii na ml. Fertilizace se provádí v inkubátoru při teplotě 39 °C v humidním prostředí a embrya se zde vyvíjí ještě 7 dní. (Baldassarre, Fumus, De Matos, & Pessi, n.d.) U prasat nastává často problém s polyspermií. Děje se tomu tak velmi často u IVF a ukázalo se, že na blok polyspermie mají velký vliv buňky vejcovodů (oocyty bývají odebírány chirurgicky jako preovulační). Problém polyspermie se dá tedy řešit změnou média během IVF a to nahrazením dosud používaného kofeinu adenosinem, přidáním gonadotropinů, cysteinu a thiolových sloučenin. Produkce prasečích embryí má velký komerční význam a je důležitá pro základní výzkum. Prasata jsou svou fyziologií velmi podobná člověku, a proto se transgenních prasat často využívá k produkci některých specifických proteinů (Abeydeera, n.d.). U koní, jak již bylo řečeno

výše, je IVP problematičká. K oplodnění *in vitro* lze použít pouze ICSI. Dále také u embryí vzniklých pomocí IVF/ICSI jsou přítomné morfologické odchylky od normálního stavu, jako např. že embryonální obal není formován jako kultura buněk a *zona pellucida* plně neexpanduje. I přes tyto deformace jsou ale embrya plně životaschopná. Kvalitnější potomstvo se ale získává, pokud je oocyt oplodněn uvnitř matky. (Carnevale & Sessions, 2012) Oocyty jsou citlivé na teplotní šok a je nutno sledovat teplotu již při odběru. Oocyty zrají na médiu TCM 199, které je doplněno o 10% telecí sérum a gonadotropiny za teploty 38,5 °C. Po 20 – 24 hodinách maturace se objevuje první pólóvé tělísko a oocyty jsou připraveny na oplodnění. Pokud vše probíhá optimálně, dosáhne 90 % oocytů metafáze II. Před oplodněním jsou částečně odstraněny buňky *corona radiata*, které obklopují oocyty. (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

Dělení embryí, bisekce a reprodukční klonování

Dělení embryí skotu bývá využíváno pro zvýšení počtu embryí od konkrétní samice, nebo pro produkci geneticky identických zvířat pro biomedicínské výzkumy. Pro tyto účely je stejně vhodné rozdělení blastomer ve 2 – 4 buněčném stádiu, ale i bisekce embrya ve stádiu moruly nebo blastocysty. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

Klonování pomocí přenosu jader využívá blastomery z embrya o 8 – 16 buňkách. Somatické klonování je také úspěšně používáno (dnes je možné už u 23 druhů zvířat). Skot je úspěšně klonován pomocí transferu somatických jader (stejně efektivní za využití dospělého jedince i plodu jako donoru jádra). Buňky využívané jako donory jádra bývají nejčastěji fibroblasty. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012) Takto klonovaná zvířata jsou pro chovatele atraktivní, protože tak mohou docílit chtěného fenotypu, klonují se například samice s kvalitní produkcí mléka a samci s kvalitním potomstvem. (Galli et al., 2003, podle Galli 1996)

Transgenní zvířata bývají využívána i pro přítomnost α -1 antitrypsinu faktoru IX v mléce. (Rodriguez-Martinez & Rodriguez-Martinez, 2012, podle Garner, 2008)

Závěr

Tato bakalářská práce si klade za cíl charakterizovat různé typy neplodnosti a specifikovat možné příčiny. Snaží se přiblížit jednotlivá vyšetření, které pacienti podstupují při léčbě neplodnosti, a způsoby léčby konkrétních poruch. Práce také poskytuje sepsané metodologické přístupy jednotlivých technik a zkoumá jejich výhody, nevýhody a ukazuje případná rizika.

ART (techniky asistované reprodukce) jsou již využívány přes 30 let, přesto nejsou zcela ještě prozkoumána všechna možná rizika z nich plynoucí. Na možné problémy se přichází až pomocí retrospektivních studií. Tato práce poukazuje na problémy často plynoucí z ART, jako jsou například mnohočetná těhotenství a problémy s nimi spjaté (nízká porodní hmotnost, předčasné porody, zvýšená perinatální úmrtnost). Řešením by bylo využívání eSET (efektivní transfer jediného embrya), což ale stále ještě není součástí běžné praxe ve všech státech.

Retrospektivní studie by bylo také vhodné použít pro zjištění, zda ART odstraňují neplodnost z populace, nebo zda jen řeší problém konkrétního páru bez ohledu na plodnost jeho potomků. Tento problém se jeví aktuální hlavně při častém nadužívání metody ICSI, ke které bývá v centrech asistované reprodukce často přistupováno jako k první volbě. Jak tato práce ukazuje, tato metoda skýtá mnohá rizika. U dětí z ICSI se vyskytují častěji kongenitální malformace, epigenetické syndromy, chromozomální abnormality, hypospadiie, aneuploidie, ale dokonce i poruchy neplodnosti vzniklé *de novo*. Je proto potřeba do budoucna tuto metodu používat jen v případech, kdy jiné možnosti nejsou realizovatelné.

Dalším cílem práce je používání ART u zvířat, kde jsou tyto techniky používány jak pro šlechtitelské a chovatelské účely, ale také pro vědecké a farmakologické výzkumy.

K vědomostem ohledně ART nám velmi pomáhá translační výzkum, který nám objasňuje principy reprodukční biologie. Díky transgenním organismům lze zkoumat funkce proteinů a genů účastnících se jednotlivých fertilizačních reakcí. Díky těmto modelům se mohou v budoucnosti objasnit dosud neznámé příčiny idiopatické neplodnosti. Každý zvířecí model má své výhody a podle zájmu studia by měl být zvolen konkrétní modelový organismus.

Seznam použitých zkratk

AFC Antral Follicle Count
AGS adrenogenitální syndrom
AI umělá inseminace
AID umělá inseminace spermatem od dárce
AIH umělá inseminace spermatem od partnera
AMH antimüllerický hormon
AR asistovaná reprodukce
ART techniky asistované reprodukce
cAMP cyklický adenosin monofosfát
CBAVD kongenitální bilaterální absence *vas deferens*
CC klomifen citrát
COC kumulační oocytový komplex
COH ovariální hyperstimulace
CP mozková obrna
DHT dihydrotestosteron
DNAH₁ dynein axonemal heavy chain 1
DPY_{19L2} dpy-19-like 2
EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová
ET embryotransfer
FSH folikuly stimulační hormon
GAPDHS glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza-spermatogenní
GnRH gonadotropní hormon
hCG chorionový gonadotropin
hMG humánní menopauzální gonadotropin
HOST test hypo-osmotického otoku
H4K12ac acetylace histonu H4 na lysinu 12
ICI intracervikální inseminace
ICSI intracytoplasmatická injekce spermie
IgG imunoglobulin G
IgM imunoglobulin M
IM nepohyblivé spermie
IUI intrauterinní inseminace

IVF *in vitro* fertilizace
IVP *in vitro* produkce embryí
IVM *in vitro* maturace
KET kryokonzervace a embryotransfer
LH luteinizační hormon
MAR mixed antiglobulin reaction
MESA micro epididymal sperm aspiration
MMAF multiple morphological abnormalities of the flagella
MOET superovulace a embryotransfer
NP neprogresivně pohyblivé spermie
OAT oligoastenoteratozoospermie
OPU ovum-pick-up
PCT postkoitální test
PCOS syndrom polycystických ovarií
PR progresivně pohyblivé spermie
PTX pentoxifylin
SET transfer jediného embrya
SS saktosalpinx
TAT tray agglutination test
TDS syndrom testikulární dysgenese
TESE chirurgická extrakce spermatu z varlat
VEGF vaskulární endotelový růstový faktor
WHO světová zdravotnická organizace

Seznam použitých zdrojů

Primární zdroje

Abeydeera, L. R. (n.d.). *IN VITRO PRODUCTION OF EMBRYOS IN SWINE.*

http://hannah.wrigley.me.uk/course_material-bmedsc/abeydeera.pdf

Alukal, J. P., & Lamb, D. J. (2008). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)--what are the risks? *The Urologic Clinics of North America*, 35(2), 277–88, ix–x.

<https://doi.org/10.1016/j.ucl.2008.01.004>

Arora, P., Sudhan, M. D., & Sharma, R. K. (1999). INCIDENCE OF ANTI-SPERM ANTIBODIES IN INFERTILE MALE POPULATION. *Medical Journal, Armed Forces India*, 55(3), 206–208. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(17\)30443-4](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(17)30443-4)

Baldassarre, H., Fumus, C. C., De Matos, D. G., & Pessi, H. (n.d.). *IN VITRO PRODUCTION OF SHEEP EMBRYOS USING LAPAROSCOPIC FOLLICULOCENTESIS: ALTERNATIVE GONADOTROPHIN TREATMENTS FOR STIMULATION OF OOCYTE DONORS.*

<https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/36282253/Therio1996->

[LOPU_in_sheep.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1533416253&Signature=POTnm0vLOMUo76oTrIWQEOAjfCs%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DIn_vitro_maturation_and_fertilization_of.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/36282253/Therio1996-LOPU_in_sheep.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1533416253&Signature=POTnm0vLOMUo76oTrIWQEOAjfCs%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DIn_vitro_maturation_and_fertilization_of.pdf)

Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 22(6), 1506–1512.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dem046>

Campos, K. E., Volpato, G. T., Calderon, I. M. P., Rudge, M. V. C., & Damasceno, D. C. (2008). Effect of obesity on rat reproduction and on the development of their adult offspring. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(2), 122–125.

<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008005000001>

Carnevale, E. M., & Sessions, D. R. (2012). In Vitro Production of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(7), 367–371.

<https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2012.05.054>

Colenbrander, B., Gadella, B., & Stout, T. (2003). The Predictive Value of Semen Analysis

- in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 305–311. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x>
- Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W. G., Behre, H. M., ... Vogelsson, K. M. (2010).** World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16(3), 231–245. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>
- Cyranoski, D. (2012).** DNA-swap technology almost ready for fertility clinic. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature.2012.11651>
- Fisher, J. S., Macpherson, S., Marchetti, N., & Sharpe, R. M. (2003).** Human “testicular dysgenesis syndrome”: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction*, 18(7), 1383–1394. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg273>
- Anonym "Intrauterine insemination". (2009).** *Human Reproduction Update*, 15(3), 265–277. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp003>
- Lahteenmaki, A. (1993).** *In-vitro fertilization in the presence of antisperm antibodies detected by the mixed antiglobulin reaction (MAR) and the tray agglutination test (TAT).* *Human Reproduction* (Vol. 8). Retrieved from <http://humrep.oxfordjournals.org/>
- Manuel Montoya, J., Bernal, A., & Borrero, C. (n.d.).** *Diagnostics in assisted human reproduction.* [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61624-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61624-0)
- Margaryan, H., Dorosh, A., Capkova, J., Manaskova-Postlerova, P., Philimonenko, A., Hozak, P., & Peknicova, J. (2015).** Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0008-1>
- Miharu, N. (2005).** Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenetic and Genome Research*, 111(3–4), 347–351. <https://doi.org/10.1159/000086909>
- Milardi, D., Luca, G., Grande, G., Ghezzi, M., Caretta, N., Brusco, G., ... Garolla, A. (2017).** Prednisone treatment in infertile patients with oligozoospermia and accessory gland inflammatory alterations. *Andrology*, 5(2), 268–273. <https://doi.org/10.1111/andr.12300>
- N80-N98 Nezánětlivá onemocnění ženského pohlavního ústrojí (N80–N98). (n.d.).** Retrieved March 13, 2018, from <https://www.uzis.cz/cz/mkn/N80-N98.html>
- Mapletoft, R. J., & Hasler, J. F. (2005).** Assisted reproductive technologies in cattle: a

- review. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 24(1), 393–403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110904>
- Oei, S. G., Helmerhorst, F. M., & Keirse, M. J. N. C. (1995).** Infertility: When is the post-coital test normal? A critical appraisal. *Human Reproduction*, 10(7), 1711–1714. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136160>
- Oktem, M., Esinler, I., Eroglu, D., Haberal, N., Bayraktar, N., & Zeyneloglu, H. B. (2007).** High-dose atorvastatin causes regression of endometriotic implants: a rat model. *Human Reproduction*, 22(5), 1474–1480. <https://doi.org/10.1093/humrep/del505>
- Quinn, P., & Horstman, F. C. (n.d.).** Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro?
- Řežábek, K. (2014).** *Asistovaná reprodukce, farmakoterapie pro praxi* (Sv. 68). Praha: Maxdorf Jessenius.
- Schlegel, P. N. (2004).** Causes of azoospermia and their management. *Reproduction, Fertility, and Development*, 16(5), 561–572. <https://doi.org/10.10371/RD03087>
- Stedronska, J., & Hendry, W. F. (1983).** The value of the mixed antiglobulin reaction (MAR test) as an addition to routine seminal analysis in the evaluation of the subfertile couple. *American Journal of Reproductive Immunology : AJRI : Official Journal of the American Society for the Immunology of Reproduction and the International Coordination Committee for Immunology of Reproduction*, 3(2), 89–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6859383>
- van Houten, E. L. A. F., Kramer, P., McLuskey, A., Karels, B., Themmen, A. P. N., & Visser, J. A. (2012).** Reproductive and Metabolic Phenotype of a Mouse Model of PCOS. *Endocrinology*, 153(6), 2861–2869. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1754>
- Vieweg, M., Dvorakova-Hortova, K., Dudkova, B., Waliszewski, P., Otte, M., Oels, B., ... Paradowska-Dogan, A. (2015).** Methylation analysis of histone H4K12ac-associated promoters in sperm of healthy donors and subfertile patients. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0058-4>
- Zákony ČR onLine - úplná znění zákonů, přehled právních předpisů platných v ČR a zákony zdarma. (n.d.).** Retrieved July 30, 2018, from <http://www.zakonycr.cz/seznamy/373-2011-Sb-zakon-o-specifickych-zdravotnich-sluzbach.html>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., ... van der Poel, S. (2009).** The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization

(WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human Reproduction*, 24(11), 2683–2687. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep343>

Sekundární zdroje

Amanvermez, R., & Tosun, M. (2016). An Update on Ovarian Aging and Ovarian Reserve Tests. *International Journal of Fertility & Sterility*, 9(4), 411–415.

<https://doi.org/10.22074/IJFS.2015.4591>

(citace přebrána z Grynnerup, A. G., Lindhard, A., Soren S., 2012, The role of anti – Müllerian hormone in female fertility and infertility)

Anderson, R. A., Wallace, W. H. B., & Baird, D. T. (2008). Ovarian cryopreservation for fertility preservation: Indications and outcomes. *Reproduction*.

<https://doi.org/10.1530/REP-08-0097>

(citace přebrána z Howell, S., Shalet, S., 1998, Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy)

Bähr, A., & Wolf, E. (2012). Domestic Animal Models for Biomedical Research.

Reproduction in Domestic Animals, 47, 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02056.x>

(citace přebrána z Carter, A. M., 2007, Animals model of human placentation)

Betteridge, K. J. (2006). Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives.

In *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.005>

(citace přebrána z Betteridge, K. J., 2004, New reproductive technologies in cattle: a veterinary perspective)

Coutton, C., Escoffier, J., Martinez, G., Arnoult, C., & Ray, P. F. (2015).

Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Human Reproduction Update*, 21(4), 455–485. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv020>

(citace přebrána z Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., Nygren, K. G., 2007, Internationales estimates of infertility prevalence and treatment seeking: potential need and demand for infertility medical care)

Duran, H. E., Morshedi, M., Kruger, T., & Oehninger, S. (n.d.). *Intrauterine*

insemination: a systematic review on determinants of success.

https://watermark.silverchair.com/080373.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAaYwggGiBgkqhkiG9w0BBwagggGTMIIBjwIBADCCAYgGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMv2S7yZLVptXE8G

AXAgEQgIIBWVZ4-hGUbqssXaEC3iQkuJ4HiXINZOFgls7Y-gL9-
yfDITHZIRySyAOc1Fi_3QMB_Oj7iuSp7ujafNXQvpb4WEXnC48RR2-
tYiC3M7wD5ht5IwrCQTVVrIGZohIqd4NxW1EWswUwkaF6WseJLEqqQcuvUbs4wd
Hv14PINp7fFm1zBDp_bhsW7mgfFbK6D7Eg0250ERvmTMtBRA2celo7JA_cQE-
OJVbNAAHYx6pD9xip8QqKgDCsBANNZ6Er9wxkfHNe-WD-
QmqffkciwiVnvlLe4TZum8G26vCiw7QKeWxNDRBAom9aEQ5K_Gp0OBO9sNA90
DoOzGLD2sFmIS10jd-6jhUVze4ZlyQP7rM772i6eo4dd3gzbOEWOLFnaDgIA4-
VzV5z1Jc4LkXs4LTWrCoaTnLtFFJ2onxganjtnYYrNOhjRI2yKtFwp_b_3ohW-
sCjZxurktbBMw

(citace přebrána z Cohlen, B. J., Vandekerckhove, P, te Velde, E. R., Habbema, J. D.,
2000, Timed intercourse versus intra-uterine insemination with or without ovarian
hyperstimulation for subfertility in men)

Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., ... Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2), 599–616.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8)

(citace přebrána z Galli, C., Lazzari G., 1996, Practical aspects of IVM-IVF in cattle)

Hinrichs, K. (2013). Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), 80. <https://doi.org/10.1071/RD12263>

(citace přebrána z Alm, H., Torner, H., Becker, F., Kanitz, W., Hinrichs. K., 1997,
Comparison of different methods for recovery of horse oocytes)

Kumar, N., & Singh, A. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*.

<https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>

(citace přebrána z Sciarra, J., 1994, Infertility: An International health problem)

Oei, S. G., Helmerhorst, F. M., Bloemenkamp, K. W., Hollants, F. A., Meerpoel, D. E., & Keirse, M. J. (1998). Effectiveness of the postcoital test: randomised controlled trial.

BMJ (Clinical Research Ed.), 317(7157), 502–505. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712594>

(citace přebrána z Oei, S. G., Keirse, M. J. N. C., Bloemkamp, K. W. M., Helmerhorst,
F. M., 1995, European postcoital test: opinions and practice)

Oktay, K., & Oktem, O. (2010). Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of an ongoing experience. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.006>

(citace přebrána z Lee, S. J., Schover, L. R., Pattridge, A. H., Patrizio, P., Wallace, W.

H., Hagerty, K., et al., 2006, American Society of Clinical Oncology recommendations of fertility preservation in cancer patients)

Ortega, C., Verheyen, G., Raick, D., Camus, M., Devroey, P., & Tournaye, H. (2011).

Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Human Reproduction Update*, 17(5), 684–692. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr018>

(citace přebrána z Afzelius, B. A., 1981, Genetical and ultrastructural aspects of the immotile-cilia syndrome)

Rodriguez-Martinez, H., & Rodriguez-Martinez, H. (2012). Assisted Reproductive

Techniques for Cattle Breeding in Developing Countries: A Critical Appraisal of Their Value and Limitations <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01961.x>

(citace přebrána z Garner, D. L., Seidel, G. E., 2008, History of commercializing sexed semen for cattle)