

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY
KARLOVY V PRAZE

Katedra zoologie

**Principy ovariální stimulace a odběru oocytů
u myši a člověka**

Bakalářská práce

Karolína Klinovská

školitelka: RNDr. Kateřina Hortová, PhD.

© Praha 2010

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Principy ovariální stimulace a odběru oocytů u myši a člověka“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 30.4.2010 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Hortové PhD. za ochotu, podporu a podnětné vedení práce. Dále svým rodičům za to všechno co se nedá popsat a svému odbornému pedagogickému doзору.

Seznam použitých zkratk

AMH – antimülleriánský hormon ovlivňující vývoj folikulů

BALB/c – inbrední albinotický kmen myší

BMP-15 – Bone Morphogenetic Protein, parakrinní faktor exprimovaný v ováriích

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

C57BI/6J – inbrední kmen myší, často používaný pro transgenezi

CBA – inbrední kmen myší, používaných pro výzkum geneze leukémie

COC – Cumulus-Oocyt Complex

eCG – koňský choriový gonadotropin, viz. také PMSG

ddY – outbrední kmen myší

E2 – estradiol 17 β , hlavní estrogen

EGF – epidermální růstový faktor, ovlivňující buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití

ET – embryotransfer, metoda přenosu embrya do hormonálně připravené příjemkyně

FSH – folikulo-stimulační hormon, follitropin

FVB/N – inbrední kmen myší

GDF-9 – Growth/Differentiation Factor 9, oocytární parakrinní proteinový faktor

GnRH – Gonadotropin Releasing Hormone

GVBD – Germinal Vesicle BreakDown, rozpad jaderného váčku = jádra oocyty

hCG – lidský choriový gonadotropin

hMG – lidský menopauzální gonadotropin (menotropin), obsahující LH a FSH

IGF-1 – Insulin-like Growth Factor 1

IU – mezinárodní jednotka množství substance, založená na biologické aktivitě

IUI – intrauterinní inseminace – přenos upravených spermií do ovulující příjemkyně

IVF – In Vitro Fertilizace, metoda oplození *in vitro*

LDL – Low Density Lipoprotein, transportující cholesterol a triglyceridy

LH – luteinizační hormon

MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase – serin/threonin specifická signalizační kináza

MOS - proto-onkogen, jehož produkt se podílí na regulaci dělení buněk a jejich diferenciaci

MPF - Maturation Promoting Factor, protein zásadní v regulaci buněčného cyklu a dělení

OHSS – Ovarian Hyperstimulation Syndrom, život ohrožující hyperstimulace vaječnicků

P-450arom - aromatáza, enzym konvertující androgeny na estrogény

P-450scc – „side-chain cleavage enzym, nezbytný pro konverzi cholesterolu na androgeny

PGCs – Primordial Germ Cells, zárodečné buňky na začátku ontogenetického vývoje

PhD. – zkratka akademického titulu doktor filosofie

PMSG – gonadotropin séra březích klisen, používaný pro stimulaci myši

rhFSH – rekombinantní, uměle vytvořený FSH

RNDr. – zkratka akademického titulu doktor přírodních věd

SCF – Stem Cell Factor, také Kit ligand, faktor zásadní například i v follikulogenezi

TGF- β – Transforming Growth Factor, protein zásadní v mnoha signálních drahách

uFSH – urinární FSH, získávaný přečištěním z moči

Principy ovariální stimulace a odběru oocytů u myši a člověka

Souhrn

Práce se zabývá metodami kontrolované ovariální stimulace a odběru oocytů, a jejich fyziologickým zdůvodněním. Kvůli zásadnímu postavení myši jako modelového organismu pro mnoho v současné době klíčových výzkumů, a tedy nutnosti dokonalého zvládnutí její ovariální stimulace, jsou principy uvedeny v první řadě na jejím příkladě. Práce sumarizuje dostupná data a protokoly administrací ve vztahu k možným faktorům jejich úspěšnosti, jako jsou vlivy prostředí, kmen, čistota použitých hormonů a jiné. Každý typ protokolu je doplněn o možné negativní dopady, které může stimulace mít na kvalitu získaných buněk a jejich další vývoj.

Vzhledem k faktu, že se neplodnost stává stále větším problémem lidské populace a ovariální stimulace k jejímu řešení pomocí asistované reprodukce neodmyslitelně patří, seznamuje práce čtenáře v poslední části také s touto problematikou. Předmětem zájmu je zde ovariální stimulace jak za účelem získání oocytů, tak jako příprava pro embryotransfer. Uvedené typy protokolů jsou obecně porovnány na základě použitých hormonů, úspěšnosti v programech In vitro fertilizace (IVF) a četnosti jejich použití.

Klíčová slova:

Ovariální stimulace, myš, embryotransfer, asistovaná reprodukce, dárcovství oocytů

Principles of ovarian stimulation and oocyte collection in mouse and human

Abstract

This thesis deals with methods of controlled ovarian stimulation and oocyte retrieval on physiological basis. Mouse has been major model organism for wide range of key researches and being able to stimulate its ovarian functions correctly is necessary. That is why mouse stimulation is main topic of this thesis. It summarizes available data and stimulation protocols in relation to factors which can affect the result as a condition, strain, quality of hormones used in administration and others. Potential affections on oocyte and embryo quality are mention according to specific types of administration protocols.

Human infertility is slowly becoming common and one of the techniques used to treat it in assisted reproduction is also ovarian stimulation. In the end of this thesis is a chapter dealing with this commonly used method. It is focused on stimulation for oocyte retrieval, as well as on stimulation of recipient mother in embryotransfer. Differences based on hormones, success in In vitro fertilization programme (IVF) and application frequency are mentioned.

Key words:

Ovarian stimulation, mouse, embryotransfer, assisted reproduction techniques, oocyte donation

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 7 -
OBSAH	- 11 -
1. ÚVOD	- 13 -
2. CÍLE PRÁCE A METODIKA	- 13 -
3. OBECNÝ TEORETICKÝ ÚVOD	- 15 -
3.1. OOGENEZE A FOLIKULOGENEZE.....	- 15 -
3.1.1. <i>Gonadotropin nezávislá fáze růstu folikulu</i>	- 15 -
3.1.2. <i>Antrální – gonadotropin závislá fáze růstu folikulu</i>	- 17 -
3.1.3. <i>Ovulace</i>	- 18 -
3.2. ENDOKRINNÍ REGULACE OOGENEZE A FOLIKULOGENEZE	- 20 -
3.2.1. <i>Ovariální cyklus</i>	- 20 -
3.2.2. <i>GnRH</i>	- 21 -
3.2.3. <i>FSH a LH</i>	- 21 -
3.2.4. <i>Peptidické hormony – inhibin a aktivin</i>	- 22 -
3.2.5. <i>Ovariální steroidy</i>	- 23 -
3.2.6. <i>hCG – lidský choriový gonadotropin</i>	- 23 -
3.2.7. <i>AMH – antimülleriánský hormon</i>	- 24 -
3.3. <i>ESTRÁLNÍ CYKLY A REPRODUKCE MYŠÍ</i>	- 24 -
4. OVARIÁLNÍ STIMULACE MYŠÍ	- 25 -
4.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	- 25 -
4.1.1. <i>Hormony používané u ovariální stimulace myší</i>	- 26 -
4.1.2. <i>Výběr kmene myší</i>	- 27 -
4.1.3. <i>Chov a správná manipulace s myšmi při ovariální stimulaci</i>	- 28 -
4.1.4. <i>Odběr oocytů/embryí</i>	- 29 -
4.2. JEDNOTLIVÉ ZPŮSOBY ADMINISTRACE HORMONŮ A TYPY STIMULAČNÍCH PROTOKOLŮ.....	- 30 -
4.2.1. <i>PMSG (eCG) + hCG</i>	- 30 -
4.2.2. <i>hMG + hCG</i>	- 32 -
4.2.3. <i>Čistý FSH (či jeho analogy) + hCG</i>	- 33 -
4.2.4. <i>Použití GnRH agonistů a antagonistů v protokolech</i>	- 34 -
4.2.5. <i>Superovulace pomocí administrace antiséra neutralizujícího inhibin</i>	- 35 -
5. OVARIÁLNÍ STIMULACE ČLOVĚKA	- 36 -
5.2. OBECNĚ O OVARIÁLNÍ STIMULACI ČLOVĚKA.....	- 36 -
5.3. TESTOVÁNÍ (SCREENING) OVARIÁLNÍ REZERVY	- 37 -
5.4. METODIKA OVARIÁLNÍ STIMULACE.....	- 38 -
5.4.1. <i>Používané hormony</i>	- 38 -

5.4.2.	<i>Jednotlivé protokoly administrace.....</i>	- 39 -
5.5.	ODBĚR OOCYTŮ (OVUM PICK-UP, OPU)	- 42 -
5.6.	MOŽNÉ KOMPLIKACE STIMULACE A NEPŘÍZNIVÉ EFEKTY NA KVALITU BUNĚK.....	- 43 -
5.6.1.	<i>Vedlejší efekty a komplikace ovariální stimulace na pacientku.....</i>	- 43 -
5.6.2.	<i>Vedlejší efekty ovariální stimulace na kvalitu získaných oocytů a ovariální funkci -</i>	<i>44 -</i>
6.	ZÁVĚR	- 45 -
7.	POUŽITÁ LITERATURA.....	- 47 -

1. Úvod

Díky zvyšujícímu se množství neplodných párů se zdokonalování metod asistované reprodukce stalo jedním ze základních úkolů klinické reprodukční biologie posledních desetiletí. Kontrolovaná ovariální stimulace je nezbytným nástrojem léčby infertility. Její dokonalé zvládnutí je esenciální pro úspěch asistované reprodukce, stejně tak jako přísná kontrola případných negativních dopadů, které může na zdraví matky i dítěte mít.

Pro výzkum a vývoj nových typů hormonů a jejich aplikačních protokolů ze zřejmých důvodů nelze použít člověka. Myš jako nejčastější savčí modelový organismus je v tomto případě možností první volby. I přes nesporné výhody potkana a prasete zůstává ovariální stimulace myši nejlepším výzkumným nástrojem pro optimalizaci protokolů administrací.

Dokonalé ovládnutí regulace myši folikulogeneze a možnost generovat větší množství oocytů či embryí samozřejmě neslouží pouze výzkumům zaměřeným na léčbu lidské neplodnosti. Mnoho v dnešní době zásadních projektů je na této schopnosti přímo závislých – např. transgenetické pokusy, transplantační biologie, výzkum kmenových buněk a jiné. Proto jsou dokonalá optimalizace, možnost výběru z více protokolů a znalost možných vlivů na kvalitu získaných buněk esenciálními požadavky každé tímto se zabývající laboratoře.

Pojem kontrolovaná ovariální stimulace je někdy nahrazován spojením ovariální hyperstimulace, z důvodu vývoje mnoha folikulů, nebo superovulace (používaná hlavně u hospodářských zvířat). V této práci je pojmenovávána nejpřesnějším názvem ovariální stimulace, který je na druhou stranu také velice široký a zahrnuje všechny typy stimulace vaječnicků od hormonální antikoncepce, přes produkci oocytů, embryí až po komplexní řešení neplodnosti. Tento široký pohled na problematiku výrazně přesahuje rámec této práce, která se soustředí hlavně na techniky používané k získávání většího množství kvalitních oocytů či embryí.

2. Cíle práce a metodika

Cílem této bakalářské práce je sumarizovat dostupná data týkající se principů a protokolů ovariální stimulace na hlavním savčím modelovém organismu, myši, porovnat

jejich efektivitu, oblasti možného využití a praktičnost na základě faktorů jako jsou vnější podmínky, kmen myši a čistota použitých hormonů. Tato část bude poskytovat souhrn alternativních metod, které se laboratorím nabízejí při řešení metodiky výzkumů zahrnujících ovariální stimulaci. Na základě dostupných protokolů bude v této práci také uvedeno základní rozdělení ovariální stimulace u člověka, s cílem poskytnout ženám podstupujícím tuto proceduru ucelené informace, odkazující na vztah k fyziologickým funkcím.

Předkládaná práce vychází z rešerší primární a sekundární literatury, sumarizuje dostupné protokoly a údaje a dává je do souvislostí s fyziologickými principy oogeneze, folikulogeneze a jejich endokrinních regulací. Pro části zabývající se obecnou fyziologií a ovariální stimulací myši považuje autorka za stěžejní vědecké články, dostupné z internetových databází, pro část týkající se ovariální stimulace člověka knihu „In Vitro Fertilization: A Practical Approach“ editovanou autorem Davidem K. Gardnerem.

..

3. Obecný teoretický úvod

3.1. Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze začíná již v embryonálním období vcestováním primordiálních pohlavních buněk (primordial germ cells - PGCs) do genitální lišty. Od této chvíle se označují jako oogonie, usídlují se v korové části budoucího ovária a prodělávají sérii mnoha mitotických dělení. U některých skupin živočichů (např. u *Drosophily*, ale i u myši) jsou budoucí gamety v tomto stadiu spojeny v klastry (syncytia) v důsledku nedokonalé cytokineze (Pepling and Spradling 1998). V této chvíli je pohlavních buněk nejvíc za celý život samice. Vstupují do prvního meiotického dělení, které je následně zastaveno v profázi I, ve stadiu zvaném diktyotene. Od tohoto tzv. prvního meiotického bloku se nazývají primární oocyty a v meioze nepokračují až do chvíle těsně před ovulací. Během perinatálního období se vybrané oocyty obalují jednou vrstvou plochých somatických pre-granulózních buněk a bazální membránou, čímž se stávají tzv. primordiálními folikuly. Pokud vývoj probíhá v syncytiích (myš), vcestovávají pre-granulosové buňky do syncytia, obalují zárodečné buňky a celý útvar prodělává vývojově programovaný rozpad na jednotlivé primordiální folikuly (Pepling and Spradling 2001). Touto chvílí začíná folikulogeneze (vývoj folikulu), která probíhá souběžně s oogenezí (vývojem oocytu), přičemž jsou tyto procesy na sobě regulačně závislé. Zbylé primární oocyty, které nejsou obaleny pre-granulosovými buňkami, jsou degradovány apoptosou.

3.1.1. Gonadotropin nezávislá fáze růstu folikulu

Primordiální folikuly tvoří zásobu pohlavních buněk pro reprodukčně aktivní život samice. Donedávna se soudilo, že je to zásoba jediná. V současné době je velkým tématem schopnost vytvářet postnatálně nové oocyty z kmenových buněk (Johnson et al. 2004), avšak tato možnost stále zůstává kontroverzní a nebyla dosud obecně přijata. Po dobu reprodukčního věku zůstává naprostá většina folikulů ve stádiu primordiálního folikulu a nepokračuje v dalším vývoji. Ty, které jsou vybrány (rekrutovány) do růstové fáze, prochází změnami ve velikosti, morfologii a fyziologii bez toho, aby primární oocyt uvnitř folikulu až do posledního okamžiku před ovulací pokračoval v meioze. Mechanismus výběru folikulů do růstové fáze zůstává v mnoha směrech neznámý.

První pozorovatelnou změnou v morfologii vybraného folikulu je přeměna plochých granulózniých buněk na kuboidální, společně se zvětšením průměru oocyty. Se začátkem růstu folikulu se objevuje také zona pellucida, extracelulární glykoproteinová vrstva oddělující oocyt od somatických buněk. Skrze ni vedou buněčné výběžky, zajišťující díky z konexinů vytvořeným vodivým spojením mezibuněčnou komunikaci mezi granulosovými buňkami a oocytem. Vodivá spojení ze specifických konexinů vznikají později i mezi granulosovými buňkami a jejich vrstvami navzájem, čímž vzniká elektrofyziologické i funkční „velmi úzce spolupracujících buněk (<http://www.endotext.org/female/female1/femaleframe1.htm>). V této fázi se útvar nazývá primární folikul.

Jakmile se začínají granulozní buňky množit a vytváří se vícevrstevný obal oocyty, folikul se stává tzv. sekundárním. Vstupuje tím do fáze extenzivního růstu, diferenciaci a změn v oocyty samotném. Ten v období růstu pod vlivem reaktivace genomu intenzivně mění své orgány, cytoplazmu i expresi genů, syntetizuje množství proteinů a RNA se snahou získat meiotickou kompetenci (schopnost vydělit první pólovou buňku a dosáhnout metafáze II) a dostatečnou zásobu proteinů a mRNA nejen pro svůj růst, ale i pro pozdější kritické kroky – maturaci, úspěšnou fertilizaci a časný embryonální vývoj.

Důležitým krokem při vzniku plně vyvinutého sekundárního folikulu je obalování somatickými thekálními buňkami a jejich diferenciaci. Thekální buňky se na vnější straně bazální membrány diferencují na theca interna a externa. Vznik théky je spojen s vaskularizací krevními cévami, které obalují folikul, zásobují ho živinami, přivádí k němu hormony a odvádí folikulární sekreční produkty. Thekální buňky jsou také zásadní v hormonální regulaci, protože na svém povrchu exprimují receptor pro luteinizační hormon (LH) a pod jeho vlivem produkují androgeny – hlavně androstenedion, zásadní v steroidogenezi.

Plně vyvinutý sekundární folikul se skládá z vzrostlého oocyty zastaveného v diktyotenním stadiu, zona pellucida, několika vrstev granulosových buněk, bazální membrány, theca interna, theca externa a kapilární síť uvnitř théca.

Pokud je oocyt vyjmut z folikulu, který dokončil svůj preantrální růst (neboli plně vzrostlý sekundární folikul před formací antra – dutiny naplněné folikulární tekutinou), spontánně pokračuje v meioze. Již je tedy meioticky kompetentní, schopný vydělit první pólovou buňku a dosáhnout metafáze II. V tom mu brání granulozní buňky, udržující vysoké hladiny intraovariálního cAMP až do chvíle vrcholu koncentrace LH v plazmě (dále v textu uváděn jako LH peak) před ovulací

Sekundárním folikulem končí na gonadotropinu nezávislá fáze růstu folikulu, ovlivňovaná převážně autokrinními a parakrinními faktory. Na jejím začátku probíhá tzv. iniciální, nebo také primární výběr primordiálních folikulů k růstu (initial recruitment) (McGee and Hsueh 2000). Ten je kontinuální, od chvíle vzniku primordiálních folikulů po celý reprodukční život samice. Folikulu poté trvá v závislosti na druhu organismu od týdnů po mnoho let, než dosáhne stadia plně vyvinutého preantrálního folikulu. Následný vývoj od časného antrálního folikulu po preovulační, tzv. Graafův folikul se objevuje až po nástupu puberty a je již gonadotropin-dependentním procesem. Dochází zde k takzvanému cyklickému výběru, nebo také sekundárnímu recruitmentu folikulů (McGee and Hsueh 2000), kdy je kohorta několika raných antrálních folikulů pod vlivem zvýšené koncentrace FSH v krvi vybírána k dokončení růstu. K tomu dochází na konci luteální fáze cyklu předcházejícímu ovulaci a vybrány do kohorty jsou ty folikuly, pro něž bylo dosaženo prahové koncentrace FSH (ta může být pro každý folikul jiná). Jeden folikul z kohorty se stane dominantním, určeným k ovulaci, zatímco ostatní jsou odsouzeny k atresii (hormonálně řízené apoptose folikulů)

3.1.2. Antrální – gonadotropin závislá fáze růstu folikulu

Antrální vývoj folikulu je charakteristický přítomností dutiny ve folikulu, vyplněném tekutinou - antra. V poslední době je nejpřijímanější hypotéza, že tekutina, která antrum vyplňuje, vniká do vrstvy granulosoých buněk z thekálních kapilár po osmotickém gradientu vytvářeném granulosoými buňkami – jejich produkcí glykosaminů a proteoglykanů (Clarge *et al.* 2006). V granulosoé vrstvě tak nejdříve vznikají malá ohniska kapaliny, která se postupně za účasti remodelace granulosoých buněk spojují a formují dutinu antra.

Z několika antrálních folikulů, vybraných do kohorty, získává v průběhu folikulární fáze ovariálního cyklu jeden (či více, například u králíka) díky své nejvyšší schopnosti reagovat na FSH dominanci, a jeho sonografický nálezn je spojen se zvýšením estradiolu v séru (Vansantbrink *et al.* 1995). Vlivem zvýšené produkce estrogenů v průběhu folikulární fáze se snižuje koncentrace FSH. Většina folikulů z kohorty má relativně menší množství FSH receptorů, nedostává dostatek signálů a zpomaluje svůj vývoj, na rozdíl od nejvyspělejšího, dominantního, který dokáže díky mnohem vyššímu množství FSH receptorů reagovat růstem i na toto snížené množství FSH. Z něj se stává Graafův preovulační folikul,

který po zvýšení koncentrace LH v plazmě (tzv. LH peak) ovuluje. Nedominantní folikuly kohorty nedokáží díky nedostatečnému FSH signálu konvertovat androstenedion na estradiol, hladina androgenu ve folikulární tekutině se zvyšuje a folikuly jsou degradovány atresíí. (citace z let kolem 80' doplnit)

Postupným vývojem a růstem antrálního folikulu se vlivem FSH a morfogenního gradientu oocytem vytvářeného GDF-9 (Erickson & Shimasaki 2000) diferencují granulозní buňky. V preovulačním (Graafově) folikulu se objevují tři typy – membrana granulosa, periantrální a kumulární buňky (někdy se membrana granulosa a periantrální buňky společně označují jako murální granulosa). Všechny exprimují na svém povrchu FSH receptory, ale každý na stimulaci FSH reaguje produkcí jiných molekul. Membrana granulosa je vrstva vzdálená nejdále od vlastního oocytu, přiléhající k bazální membráně. Je metabolicky nejaktivnější, pod vlivem FSH exprimuje enzymy potřebné pro steroidogenezi, LH receptory a jiné molekuly (Ericsson 2000). Periantrální buňky, někdy uváděné jako subpopulace buněk membrany granulosity, vystýlají dutinu antra a jsou po ovulaci proměněny na velké luteální buňky corpus luteum. Kumulární buňky obalují vlastní oocyt, který je nyní ve folikulu umístěn asymetricky na takzvaném vejconosném hrboleku (cumulus oophorus). Nejsou místem steroidogeneze, ale produkují kyselinu hyaluronovou, uplatňovanou v tzv. expanzi kumulu. Při ovulaci tyto buňky opouští folikul společně s oocytem a hrají důležitou roli v umožnění fertilizace.

3.1.3. Ovulace

Ovulací rozumíme puknutí dominantního folikulu a vyplavení oocytu společně s kumulárními buňkami (tzv. COC komplex – cumulus-oocyte) do peritoneální dutiny. Zde je COC zachycen třásněmi nálevky vejcovodu (fimbriemi infandibula), vstupuje do oviduktu a dále je posouván ciliemi na cestě k děloze. V tuto dobu může být oocyt oplodněn spermii.

Spouštěcím mechanismem ovulace je tzv. LH peak, výrazné zvýšení plasmatické koncentrace luteinizačního hormonu na konci folikulární fáze růstu oocytu. Na ten reaguje pouze plně vzrostlý dominantní folikul s meioticky kompetentním oocytem. Vzhledem k tomu, že na oocytu ani na kumulárních buňkách nejsou receptory pro LH (Peng *et al.* 1991; Eppig *et al.* 1997), je jasné, že na LH peak reagují buňky murální granulosity a ty předávají informaci ostatním. LH peak vyvolává ve všech buňkách folikulu změny genové exprese a produkci specifických molekul. Murální granulosa produkuje hlavně EGF-like

molekuly, které jsou signální pro kumulární buňky a oocyt, dále proteiny regulující luteinizaci granulosa, enzymy zúčastněné v biosyntéze progesteronu a proteázy, důležité pro rupturu folikulu. Kumulární buňky syntetizují faktory potřebné k expanzi kumulu a její regulaci. Oocyt podstupuje rozpad zárodečného váčku (Germinal Vesicle Break Down – GVBD) a znovuzahajuje meiozu. Také produkuje plasminogenní aktivátor, který společně s folikulární kolagenázou a prostaglandiny působí zvýšení tlaku intrafolikulární tekutiny, lokalizované stahy hladkého svalstva v ováriu a samotný proces vypuštění folikulu (Gilbert 2007).

Dalším procesem nutným pro úspěšnou přirozenou ovulaci a vstup do nálevky vejcovodu je tzv. expanze kumulu (Talbot *et al.* 2003) . Spočívá v produkci velkého množství extracelulární matrix bohaté na hyaluronovou kyselinu kumulárními buňkami. Objem COC komplexu se tím několikanásobně zvětšuje. Velkou roli v spouštění a regulaci tohoto děje hrají nejen faktory kumulárních buněk, ale také oocytem produkované látky, například GDF-9 (Elvin *et al.* 1999) a BMP-15 (Yoshino *et al.* 2006)

Po celou dobu folikulogeneze až do této chvíle zůstával rostoucí oocyt zastaven v diktyotenním stadiu prvního meiotického dělení. LH peak a ovulace spouští tzv. maturaci oocytu, zrání, kdy je uvolněn meiotický blok a oocyt nejdříve dosahuje metafáze I a následně i metafáze II. Nejprve dochází k rozpadu jadérka, kondenzaci chromosomů, rozpadu jaderné membrány a tvorbě dělicího vřeténka. Následuje vydělení 1. pólové buňky, profáze a metafáze druhého, homotypického dělení. V tomto stadiu se meioza zastavuje druhým meiotickým blokem a oocyt s vydělenou první pólovou buňkou takto putuje oviduktem. K dokončení meiozy dochází po oplození. V znovuzahájení a regulaci meiozy oocytu hrají zásadní roli MPF (Maturation Promoting Factor), MOS (proto-onkogen), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) a intracelulární hladiny cAMP a Ca^{2+} .

Zbytek folikulu po ovulaci (murální granulosa a thekální buňky) luteinizuje – ztrácí své koncentrické uspořádání, diferencuje se ve fenotyp luteálních buněk a začíná exprimovat specifické geny. Takto se ustanovuje žluté tělísko – corpus luteum, které je významné produkcí progesteronu a estrogenu po dobu luteální fáze ovariálního cyklu a začátku gestace.

3.2. Endokrinní regulace oogeneze a folikulogeneze

Ovariální funkce je řízena hlavně dvěma hypofyzárními gonadotropiny, folikulo-stimulačním hormonem (FSH) a luteinizačním hormonem (LH). Ty jsou z adenohipofýzy vylučovány ve velmi nízkých koncentracích až do nástupu puberty. Přestože se preantrální vývoj folikulu tradičně považuje za gonadotropin-independentní fázi, mnoho prací ukazuje, že i když jsou preantrální folikuly schopné se vyvíjet v samicích s defektem v FSH receptorech, jejich počet či kvalita je mnohem menší, než při normálním množství FSH (Gulyas *et al.* 1977). Expres FSH receptorů je prokázána již v raných stádiích folikulárního vývoje (Roy *et al.* 1987).

Největší vliv však mají gonadotropiny od nástupu pohlavní zralosti - puberty dál. Objevuje se pulzní vylití gonadotropin-releasing hormonu (GnRH) z hypotalamu, který putuje portálním oběhem k adenohipofýze, váže se na receptor na povrchu gonadotrofů (buněk schopných produkovat gonadotropiny) a kaskádou signalizačních dějů způsobuje vylití jak FSH, tak LH. Ty se následně dostávají oběhem k vaječnícům, kde stimulují produkci estrogenů a progesterinů. Ty zase zpětnově inhibují produkci FSH a LH. Za pomoci mnoha faktorů, včetně ovariálních inhibinů a aktivinů se ustanovuje složitý regulační cyklus, umožňující uzrání dominantnímu folikulu, jeho ovulaci a přípravu organismu na možné oplození a embryonální vývoj. Je zde propojen estrální či menstruační cyklus hormonálních změn s ovariálním cyklem (střídání folikulární a luteální fáze) a endometriálním cyklem (proliferace, sekrece a degenerace endometriální tkáně).

3.2.1. Ovariální cyklus

Ovariální cyklus začíná folikulární fází, trvající od konce předchozího cyklu (u lidí začátek menstruace) do ovulace. Těsně před jejím začátkem dochází ke krátkému zvýšení koncentrace FSH, které je spojeno s cyklickým recruitmentem kohorty antrálních folikulů. Ty začínají překotně růst, proliferovat a pod vlivem LH produkovat zvyšující se množství estradiolu. Jeden či více z těchto folikulů získává dominanci a je tím předurčen k ovulaci, zatímco ostatní k atresii. Estradiol působí negativně na produkci gonadotropinů po celou folikulární fázi, až těsně před ovulací se regulace změní na pozitivní a spouští LH peak, způsobující ovulaci dominantního folikulu. Stejně tak se před ovulací mírně zvedají i koncentrace progesteronu a aktivinu.

Po ovulaci oocyty s kumulárními buňkami se zbylé části folikulu mění na corpus luteum, podle kterého se další fáze nazývá luteální. Membrana granulosa, periantrální buňky a thekální buňky jsou anatomicky a fyziologicky přeměněny na buňky luteální, které produkují progestin progesteron, estrogen a inhibin. Tyto látky společně tlumí osu hypotalamus-hypofýza, díky čemuž koncentrace FSH a LH v plazmě po dobu luteální fáze klesá. Pokud nedojde k oplození, pokles koncentrace LH způsobuje útlum luteálních buněk, koncentrace estrogeneru a progestinu klesá, což v důsledku vede k degeneraci endometriální tkáně a omezení negativní zpětné vazby na hypotalamo-hypofyzární systém. Hladina gonadotropinu stoupá, což vede k začátku nové folikulární fáze.

3.2.2. GnRH

Nejvyšší kontrolu nad hormonální regulací ovariálního cyklu má GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) z hypotalamu. Tento peptidický neurohormon je vylučován pulzně a jeho poločas rozpadu v krvi je od 2-4 minut. Frekvence vylučování má vliv na způsob a úroveň jeho vlivu na gonadotrofy. Například kontinuální administrace GnRH (nebo jeho analogů) způsobuje díky kompetitivní blokaci receptorů paradoxně snížení vyplavování gonadotropinů a funkce ovarií.

Citlivost gonadotrofů k GnRH je v průběhu ovariálního cyklu různá. Na začátku folikulární fáze jsou gonadotrofy málo citlivé k GnRH, proto každá jeho vlna vyvolá pouze malé vylití LH. Později ve folikulární fázi se citlivost zvyšuje a je vyplavováno mnohem víc LH.

GnRH zjevně působí také přímo na folikuly, neboť byly nalezeny specifické GnRH receptory na granulosaových buňkách (Dekel *et al.* 1988), GnRH analogy se váží také na luteální buňky a inhibují produkci progesteronu a mají přímý efekt na maturaci oocytů (Yang *et al.* 1995)

3.2.3. FSH a LH

Tyto hormony (folikulostimulační hormon a luteinizační hormon) jsou v průběhu cyklu vyplavovány v různých množstvích v různých časech, přičemž jsou oba pozitivně

ovlivňovány GnRH. Rozdíly v jejich produkci jsou dány působením ovariálních steroidů, inhibinů a aktivinů.

FSH a LH působí ve folikulární fázi na vyvíjející se antrální folikuly, FSH na granulозní buňky a LH jak na granulозní, tak na thekální. Oba hormony jsou pro folikulární tvorbu estrogenu esenciální. Zvýšené množství LH přibližně uprostřed cyklu, vyvolané pozitivní zpětnou vazbou estrogenů, progesterinů a aktivinu, spouští ovulaci. Po ní působí LH hlavně na diferenciaci zbylých thekálních a granulозních buněk na corpus luteum. V luteální fázi koncentrace hladin LH a FSH klesají, hlavně vlivem estrogenu, progesteronu a inhibinu na GnRH a adenohipofýzu. Zároveň s poklesem gonadotropinů ale dochází i k poklesu produkce ovariálních steroidů, který na konci cyklu vede k obnovení počáteční frekvence vyplavování GnRH, zvýšení produkce FSH a následně i LH a začátku nového cyklu.

U FSH bylo popsáno mnoho isoformů hormonu, lišících se oligosacharidovou strukturou, stupněm terminální sialylace a sulfatace (Ulloaaguirre *et al.* 1995). Všechny více jak 17 isoformů je kódováno stejným genem, ale liší se posttranslační modifikací (Creus *et al.* 1996). Liší se mezi sebou nejen strukturou, ale vlastnostmi, hlavně biologickým poločasem. Například u člověka je biologický poločas FSH sekretovaného 2-3 dny před ovulací výrazně kratší, než toho sekretovaného na začátku folikulární fáze (Booth *et al.* 1996). Preferenční sekrece hormonu s krátkým poločasem v periovulační fázi naznačuje existenci regulačního mechanismu, který kontroluje intenzitu a trvání FSH signálu dopravovaného do ovarií (Ulloaaguirre *et al.* 1995).

3.2.4. Peptidické hormony – inhibin a aktivin

Inhibin a aktivin patří do rodiny peptidických hormonů TGF- β , stejně jako antimülleriánský hormon (AMH). Jsou produkovány granulозovými buňkami folikulu, corpus luteum, placentou, a jinými tkáněmi. Jejich vyplavování z granulозových buněk je řízeno hlavně FSH, estradiolem a těsně před ovulací, kdy granulозové buňky exprimují LH receptory, také LH. Působí na gonadotrofy v adenohipofýze a ovlivňují produkci gonadotropinů nezávisle na GnRH.

Inhibin, jak je již podle jména zřejmé, inhibuje produkci FSH adenohipofýzou pomocí klasické negativní zpětné vazby. Na produkci LH nemá žádný vliv. Svým účinkem způsobuje snížení syntézy estrogenů folikulem.

Aktivin působí zcela opačně, tvorbu FSH stimuluje.

3.2.5. Ovariální steroidy

Nejvýznamnějšími ovariálními steroidy jsou estradiol, hlavní estrogen a progesteron, hlavní progestin. Jejich prekurzorem je cholesterol, který si ovariální buňky dokáží syntetizovat *de novo* či ho přijímat ve formě LDL.

Biosyntézu estradiolu popisuje tzv. „hypotéza 2 buněk a 2 gonadotropinů“. Thekální ani granulозní buňky samostatně nejsou schopny estradiol vytvořit bez stimulace jak LH, tak FSH. LH stimuluje v thekálních buňkách příjem LDL a tvorbu P-450_{sc} enzymu, nezbytného pro konverzi cholesterolu na androgeny. Thekální buňky produkují převážně androgen androstenediol, substrát pro aromatázu v granulозních buňkách. Ty pod vlivem FSH produkují velké množství této aromatázy P-450_{arom} a mění androstenediol z thekálních buněk na estradiol E2.

Estrogeny působí jak inhibičně (převážně), tak stimulačně na osu hypotalamus-hypofýza. To, zda je účinek inhibiční či naopak závisí na koncentraci a expozici hormonu. Po většinu cyklu estrogeny redukuje produkci LH a FSH pomocí inhibice GnRH. Na konci folikulární fáze, při dosažení určité koncentrace na dostatečně dlouhou dobu, se účinek estrogenů obrací a naopak zvyšují senzitivitu gonadotrofů k GnRH i jeho produkci. Tím umožňují LH peak a ovulaci.

Progesteron je nejvýznamnějším progestinem, produkovaným v reprodukčním systému granulозovými buňkami v období ovulace, žlutým tělískem v luteální fázi ovariálního cyklu a placentou v těhotenství. Na své cílové buňky působí skrz progesteronový receptor. Hraje významnou roli v ovulaci, připravuje endometrium na nidaci oocyty, spolupomáhá udržovat těhotenství a díky inhibici produkce FSH zabraňuje po dobu luteální fáze (případně těhotenství) folikulům dozrát a ovulovat (Gilbert 2003)

3.2.6. hCG – lidský choriový gonadotropin

hCG (lidský choriový gonadotropin) je glykoproteinový hormon, produkovaný předním lalokem hypofýzy ve chvíli LH peaku (Birken *et al.* 1996), v prvních fázích gestace trofoblastem blastocysty, a později syncytiotrofoblastem. Jeho funkcí je v první fázi nahrazovat LH a udržet produkci progesteronu z corpus luteum, poté podporovat výživu plodu a napomáhat imunotoleranci. Mnoho živočichů (mezi nimi i myši) neprodukuje choriový gonadotropin, ani jiné gestačně specifické hormony.

3.2.7. AMH – antimülleriánský hormon

AMH je dimerický glykoproteinový faktor patřící do rodiny TGF- β , důležitý při diferenciaci pohlaví (způsobuje involuci Müllerova ductu u mužů). U žen je produkován granulosoovými buňkami v časných antrálních folikulech. S růstem antrálního folikulu se jeho produkce snižuje. Ovlivňuje iniciální výběr folikulů, a inhibuje počáteční stádia vývoje folikulů – potlačuje vnímavost rostoucích folikulů k FSH. Pokud tento hormon chybí, dochází k předčasnému vyčerpání ovariálních zásob. Jeho koncentrace je přímo úměrná počtu antrálních folikulů a nekolísá v průběhu menstruačního cyklu. (Visser *et al.* 2006)

3.3. Estrální cykly a reprodukce myší

Obdobou menstruačního cyklu u člověka jsou tzv. estrální cykly většiny savců, včetně myší. Hlavním rozdílem je nepřítomnost menstruační fáze – u zvířat s estrálním cyklem pokud nedojde v luteální fázi ovariálního cyklu k oplození, výstelka endometria degraduje, ale neodlupuje se s krví jako u člověka. U estrálních zvířat také může mezi jednotlivými cykly docházet k různě dlouhé prodlevě. Zvířata tak mohou být podle počtu cyklů v roce monoestrická, diestrická či polyestrická.

Fáze estrálního cyklu se klasicky dělí na proestrus, estrus (vlastní období říje, probíhá ovulace), metestrus, diestrus (obdoba menstruační fáze) a anestrus (období klidu mezi cykly).

Myši patří mezi zvířata polyestrická, pohlavně aktivní jsou po celý rok. Estrální cykly jsou zásadně závislé na fotoperiodě, ve které jsou myši chovány. První estrus se objevuje mezi pátým a osmým týdnem života. Typický cyklus trvá 4,5 dne a jednotlivé fáze jsou od sebe odlišitelné typickými změnami na poševní sliznici, a tedy mikroskopickými vaginálními výtěry. Vlastní estrus trvá okolo 12 hodin a začíná většinou večer. Ovulace se objevuje třetí den estru. K připouštění dochází většinou v noci a úspěšná kopulace je spojena s tvorbou vaginální zátky. Ta vzniká ze sekretu přídatných pohlavních žláz samce, koagulujících s vaginálním sekretem samic. Jejím účelem je zabránění výtoku spermatu z vaginy. Velice často vyhřezává a je spolehlivým ukazatelem proběhlé kopulace. Po 16 až 24 hodinách se vaginální zátky rozpouští.

4. Ovariální stimulace myši

Díky nesporným výhodám, které myš jako modelový organismus poskytuje, jí je používáno v mnoha typech výzkumů fyziologických či genetických jevů. Poznání a v jisté míře ovládnutí její ovariální funkce a reprodukční biologie obecně se staly nejen cílem, ale i prostředkem výzkumníků. Od svého objevení ve dvacátých letech 20.stol je ovariální hyperstimulace, či superovulace, nezbytným nástrojem pro mnoho výzkumů, i těch v současné době klíčových, ať už se týkají embryonálních kmenových buněk, transgenních organismů, knock-out genů, či reprodukční endokrinologie.

Nezanedbatelný je samozřejmě i přínos humánní medicíně, ať už v rozpoznání fyziologie mnoha procesů, tak ve vývoji metod asistované reprodukce, která by bez mnoha poznatků získaných díky myším rozhodně nebyla tam, kde dnes.

4.1. Obecná charakteristika

Principem ovariální stimulace je vyvolání růstu u mnohem většího počtu antrálních folikulů, než v normálním cyklu, a jejich ovulace pomocí exogenních gonadotropinů. Stimulace tak mimikuje sekundární recruitment a vývoj folikulu v poslední fázi urychluje. Růst může být vyvolán jak větším množstvím různě upraveného a získaného FSH, tak pomocí gonadotropinů imitujících jeho funkci – PMSG (gonadotropin kobyliho séra neboli Equine Chorionic Gonadotropin - eCG) či hMG (lidský menopauzální gonadotropin). Ovulace stimulovaných oocytů je vyvolána nejčastěji pomocí lidského choriového gonadotropinu hCG (Human Chorionic Gonadotropin), imitujícího funkce LH peaku.

Oocyty, které se dostaly do oviduktu, jsou podle potřeby buď odebrány rovnou a zkoumány či oplodněny *in vitro*, nebo je samice připuštěna, k oplození dochází *in vivo* a následuje odběr embryí v definovaných stádiích vývoje.

4.1.1. Hormony používané u ovariální stimulace myší

4.1.1.1. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) = eCG

PMSG (neboli eCG, Equine Chorionic Gonadotropin) je glykoproteinový komplex, získávaný ze séra březích klisen. Je produkovaný endometriální tkání dělohy od 40. do 120. dne gestace. Přestože je to jedna molekula, vykazuje jak folikulostimulační (FSH-like), tak luteinizační (LH-like) vlastnosti. Používá se ke stimulaci ovariální funkce a aktivity, zlepšování plodnosti a indukci superovulace u estrálně synchronizovaných zvířat. Jeho biologický poločas je dlouhý, proto se myším podává pouze jednou během stimulace. Je k dostání ve formě sterilního filtrovaného bílého lyofilizovaného (tj. vysušený vymražováním) prášku. Po naředění se nejčastěji podává peritoneálně. Komerčně je k dostání nejčastěji pod názvem Folligon (http://www.prospecbio.com/PMSG_7_42).

4.1.1.2. hMG (lidský menopauzální gonadotropin)

hMG je směs LH a FSH v poměru 1:1, získávaný purifikací z moči žen po menopauze. Nejčastěji se podává intramuskulárně. Má kratší biologický poločas než PMSG, proto se někdy myším pro lepší výsledky aplikuje během stimulace dvakrát. Prodává se pod komerčními jmény Pergonal, Repronex, Menogon, Menopur.

4.1.1.3. hCG (lidský choriový gonadotropin)

Lidský choriový gonadotropin je nejčastěji získáván purifikací z moči. Simuluje funkci LH a spolehlivě vyvolává ovulaci. Prodává se pod mnoha jmény, například Pregnyl, Novarel, Profasi, Ovidrel, Oviterelle (rekombinantní protein)

4.1.1.4. FSH a jeho různé formy a modifikace

FSH, který se používá pro stimulace, je buď vysoce přečištěný produkt izolovaný z moči (tzv. urinární, uFSH), nebo dnes již častěji uměle vytvořený, rekombinantní rhFSH. V minulosti se velice často používal také čištěný FSH získávaný z prasečích hypofýzárních

buněk. Kvůli jeho relativně krátkému biologickému poločasu (24 hod) (le Cottonnec *et al.* 1994), a tím nutnosti častějšího opakování dávek, bylo vyvinuto několik upravených rhFSH s delším účinkem. Jedním z nich je tzv. rhFSH-CTP, rekombinantní follitropin zfúzovaný s částí hCG (Matzuk *et al.* 1990; Fares *et al.* 1992), jehož biologický poločas v člověku je 2-3krát větší než rhFSH (Bouloux *et al.* 2001). Další úpravou FSH je například glykosylace na β podjednotce (Ruman *et al.* 2005; Weenen *et al.* 2004; Perlman *et al.* 2003).

FSH a jeho analogy se nejčastěji aplikují intraperitoneálně či subkutánně.

4.1.1.5. GnRH agonisté a antagonisté

Již z názvu je patrné, že GnRH analogy (agonisté a antagonisté) vytvořeny uměle. Malými změnami v dekaeptidické struktuře je docíleno změn v biologickém poločasu hormonů (jsou mnohem odolnější vůči enzymatické degradaci). Dlouhotrvající administrací agonistických analogů GnRH je docíleno po krátkém zvýšení výrazného snížení produkce endogenních gonadotropinů hypofýzou. U použití antagonistů je snížení okamžité

4.1.1.6. Inhibin neutralizující antisérum

Antisérum neutralizující inhibin je využíváno v alternativních protokolech, snažících se zamezit negativnímu působení klasických hormonů (eCG, hCG). Jeho funkcí v těle je blokovat inhibin, tím zvýšit koncentraci FSH a vyvolat mnohočetný růst folikulů. Jeho použití může, ale nemusí být spojeno s administrací hCG (je schopno vyvolat LH peak a ovulaci díky pozitivní zpětné vazbě vznikajícího estradiolu na hypotalamus-hypofyzární osu. Antisérum proti inhibinu je nejčastěji získáváno z kastrovaných koz imunizovaných proti [Tyr30]-prasečímu inhibinu $\alpha(1-30)\text{-NH}_2$ (Wang *et al.* 2001)

4.1.2. Výběr kmene myší

Díky mutagenезi, transgenезi a gene-targetingu je množství dostupných myších kmenů čím dál větší. Výsledky protokolu ovariální stimulace, i tak zavedeného jako je ten s PMSG a hCG, se mohou výrazně lišit mezi jednotlivými kmeny, hlavně v závislosti na

jejich genetické zátěži. Zde uváděné protokoly jsou pro kmeny používané nejčastěji u transgeneze – BALB/c, C57BI/6J, FVB/N. Obecně se dá říci, že hybridní kmeny vykazují lepší výsledky než kmeny inbrední, proto se doporučuje používat pro donory embryí např. C57/BL6 x SJL F1 generaci, nebo C57BL6 x C3H F1 generaci (http://jaxmice.jax.org/manual/breeding_strategies_manual.pdf).

Výběr toho správného kmenu pro pokus se stimulací je ovlivněn také faktory, jako je agresivní chování při páření, prokázaná frekvence specifických patologií, velikost vrhu, relativní viditelnost pronukleů a samozřejmě také cenou.

4.1.3. Chov a správná manipulace s myšmi při ovariální stimulaci

Pro úspěšnou ovariální stimulaci je naprosto nezbytné správné zacházení se zvířaty. Jen při standardizovaných podmínkách je zaručena porovnatelnost, validita a nejlepší možný výsledek stimulace. Nezanedbatelná je také nutnost poskytnout zvířatům co nejkvalitnější podmínky pro život.

Estrální cykly a reprodukční život myši jsou vázány na cyklus den-noc, výsledky chovu jsou proto nejlepší, pokud je dodržen konzistentní a nepřerušovaný cyklus světla a tmy. Nepoužívanějšími cykly jsou 14 hodin světla/10 hodin tmy a 12 hodin světla/12 hodin tmy. Další doporučení pro chov jsou obecně platná pro chov většiny laboratorních živočichů – stálá teplota okolo 22°C (+/- 2°C), vlhkost vzduchu 40 - 60%, bez významných vyrušení formou hluku či vibrací, s pravidelným přísunem nutričně hodnotné potravy a přístupem k vodě *ad libitum*. Vzhledem k velkému vlivu čichových stimulů na reprodukční cyklus jsou jakékoli silné pachy „nemyší“ povahy nežádoucí, mohly by ho totiž výrazně ovlivnit. (http://jaxmice.jax.org/manual/breeding_strategies_manual.pdf).

Pro stimulaci se nejčastěji používají samičky těsně před dosažením pohlavní zralosti, či na jejím začátku, to znamená mezi 21-30 dny stáří (záleží na kmeni, například u BABL/c se první estrus objevuje mezi 33. a 40. dnem, u C67B1/6 mezi 23. a 26. dnem). Důvodem je eliminace negativních vlivů cyklických změn v hormonálních koncentracích v průběhu cyklu na stimulaci. Pro některé typy pokusů jsou ale vyžadovány samice již dospělé, se zaběhnutými estrálními cykly, kde je pro porovnatelnost a ekonomičnost pokusu žádoucí cykly samic synchronizovat. Toto se provádí za pomoci tzv. Whittenova efektu, který ukazuje, že přidáním samce k sexuálně nediferencované skupině samic se jejich estrální cykly ustanoví na stejném harmonogramu.

Přestože se ovariální stimulace u dospělých myší daří prakticky v jakémkoli dni estrálního cyklu, jsou zde určité rozdíly mezi výsledným počtem a kvalitou získaných embryí. Například u PMSG stimulace se zdá nejúspěšnějším začátek v prvním dni estrálního cyklu (Tarín et al. 2002a, 2002b).

Pro připouštění, ke kterému obvykle dochází odpoledne nebo přes noc, se doporučuje použít samců, kteří již předtím úspěšně připouštění byli. Nejčastěji je připouštěna jedna samice k jednomu samci, méně často dvě samice k jednomu samci.

Hormony při ovariální stimulaci, ale i mnoho jiných látek, je podáváno myším injekčně. Metoda injekce závisí na doporučeném způsobu a umístění látky. Hormony se nejčastěji podávají intraperitoneálně (i.p.), ale také subkutánně (s.c.), intramuskulárně (i.m.), intravenosně (i.v.) či intradermálně (i.d.). Postupy jsou standardizované a ve všech chovech známé. (http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html)

4.1.4. Odběr oocytů/embryí

Odběr probíhá ve většině případů z usmrcené myši. Jako nejlepší způsob pro tento případ se jeví cervikální dislokace. Myš je poté položena v pozici nohama vzhůru, a po očištění a vysušení abdomenu 70% etanolem (zabraňuje kontaminaci chirurgického místa chlupy) se nařízne kůže ve spodní části břicha. Další řezy jsou vedeny směrem k zadním končetinám, k *processus xiphoideus* a dále odtud směrem k předním nohám. Kůže se stáhne a odhalí se břišní dutina. Orgány trávicí soustavy se odhrnou a pod nimi je vidět vaječníky s tukovým tělískem, vejcovody a dvojrohá děloha. Oba vaječníky i s vejcovody a milimetrovým začátkem dělohy se oddělí od mesometria, tím i od břišní stěny, a přenesou se do pracovního média (odebrání kusu dělohy zabraňuje zbytečné ztrátě oocytů/embryí).

V médiu se orgány opatrně očistí od případných zbytků mesenteria, tuku a přebytečné tkáně, a jednoduchým řezem se oddělí ovarium od infundibula vejcovodu. Nejlépe pod binolupou, či stereo-mikroskopem se z ampully oviduktu opatrně dostávají oocyty či embrya, která jsou v nejlepším případě viditelná i skrz stěnu vejcovodu. Technikou je buď naříznutí oviduktu v určitém místě, po kterém oocyty/zygoty obalené kumulárními buňkami vyplavou samy, nebo jemné „cupování“ tkáně a vytlačování buněk ven. (http://members.cox.net/microinjectionworkshop/technical/get_eggs2.html). Vybrané buňky se přenáší do manipulačního media.

4.2. Jednotlivé způsoby administrace hormonů a typy stimulačních protokolů

I přesto, že je ovariální stimulace myší zavedeným a již desetiletí prováděným úkonem, kvalita získaných gamet či zygot zůstává v mnoha případech stále výrazně negativně ovlivněna. To otevírá i dnes prostor pro tříbení a upřesňování protokolů. V průběhu let jich vzniklo několik, které se s malými obměnami uplatňují v laboratořích po celém světě. Stejně tak existuje i několik „novátorských“ protokolů, které sice nevstoupili do široké praxe, ale nabízejí alternativu při neúspěších klasických postupů.

4.2.1. PMSG (eCG) + hCG

Nejrozšířenějším a nejzavedenějším protokolem pro ovariální stimulaci je ten, obsahující PMSG pro vyvolání růstu folikulů a hCG pro vyvolání ovulace. Hlavními výhodami jsou zavedené a mnohokrát úspěšně vyzkoušené protokoly, fungující na mnoho kmenů a relativně nízká cena.

Hlavním cílem administrace je tedy vyvolat pomocí PMSG růst a zrání co nejvíce folikulů, které následně pod vlivem hCG ovulují a oocyty jsou vypouštěny do oviduktu. Pokud po podání hCG dochází ke kopulaci, odebírají se v dalším kroku z oviduktu pre-zygotická embrya v jedno-, dvou-, či osmibuněčném stadiu. Pokud ne, odebírají se oocyty. V každém případě se ale buňky odebírají *post mortem*, samice by tolik mláďat (u některých kmenů je uvolněno až 40 potenciálně oplodnitelných oocytů) nedokázala donosit. Wang a Zhang v roce 2005 uveřejnili protokol, umožňující opakovaný odběr oocytů z jedné myši, stimulované v intervalech 6 dní, tato možnost nicméně není často používána, neboť je náročná na čas, provedení a neposkytuje významné výhody.

Světelný cyklus je nejčastější 12h/12h, nebo 14h světlo/10h tma. Dávka podaných hormonů závisí na druhu myši a pohybuje se mezi 2 – 5 IU, pro nejčastější kmeny je udáváno 5 IU.

4.2.1.1. Příklad protokolu pro BALB/c, C57Bl/6J, FVB/N myši

denní rytmus – 12h/12h, stáří myši 21-30 dní

1.den – kolem 14.hod i.p. PMSG 5IU

2.den – pauza

3.den – 46 – 48 hodin po dávce PMSG podat i.p. injekci hCG 5 IU, pokud jde o pre-zygotická embrya – ihned po podání hormonu přidat k samečkům (starým 8 týdnů až 1 rok)

4.den – a) pokud jsou cílem pre-zygotická embrya, ráno zkontrolovat přítomnost vaginálních zátek, pokud jsou přítomny, nejdéle do oběda získat embrya z vejcovodů

b) pokud jsou cílem ovulované oocyty – přibližně 12 hod po hCG dochází k ovulaci – odběr z oviduktů co nejdříve ráno. (Po delší době pokud nedošlo k oplození, oocyty degenerují.)

Tento protokol (s minimálními obměnami, například posun času o 1 až 2 hodiny) je u myši (na rozdíl od mnoha jiných zvířat) nejpoužívanější a nejzavedenější. Byl mnohokrát úspěšně použit v publikovaných výzkumech (například Depamphilis et al. 1988; Kovalenko et al. 1999; Tarin et al. 2002a)

Samozřejmě každá laboratoř bere v potaz své vlastní zkušenosti, které se mohou místo od místa lišit. Podle nich se nejčastěji mění množství hCG, injekční objem, denní rytmus či stáří myši.

4.2.1.2. Efekty administrace eCG/hCG na kvalitu a vývoj embrya v různých stádiích

Mnoho studií na myších ukazuje, že ovariální hyperstimulace pomocí PMSG a hCG negativně ovlivňuje kvalitu získaných gamet či embryí. Tento fenomén může být způsoben tím, že jsou k ovulaci vyvolány folikuly, které by se za normálních okolností staly atretickými, nebo by ovulovaly až později. PMSG může nepříznivě ovlivňovat vývoj embrya pravděpodobně hlavně díky svému dlouhému biologickému poločasu (Sasamoto 1972) a vysoké luteinizační aktivitě (Murphy 1984).

Velice často dochází u stimulovaných myší k vývoji abnormálních jedno- či dvoubuněčných zygot (Ertzeid & Storeng 1992; Munoz *et al.* 1994; Edwards *et al.* 2004). Jedním z důvodů může být prokázané zvýšení chromosomálních abnormalit po použití exogenních gonadotropinů (Elbling & Kolot 1985; Vogel & Spielmann 1992).

Je také dokázáno zpoždění (Van der Auwera & D'Hooghe 2001), či snížení úspěšnosti (Ertzeid & Storeng 2001) *in vitro* progrese jedno až dvoubuněčných stadií do blastocysty. Pokud se blastocysta vyvine, má často redukované množství microvilli na svém povrchu, v porovnání s blastocystami z nestimulovaných myší (Champlin *et al.* 1987).

Výzkumy také ukazují, že ovariální stimulace negativně ovlivňuje vývoj embryí *in vivo* (Ertzeid & Storeng 2001; Van der Auwera & D'Hooghe 2001). Tento jev je přisuzován nepříznivému efektu stimulace na reprodukční trakt jako celek, zejména z důvodu disbalance mezi koncentracemi estrogeneru a progesteronu, způsobené vývojem mnoha folikulů (Ghaemi *et al.* 2008; Kramer *et al.* 1990) a tím změnou morfologie, receptivity a permeability cév endometria (Kramer 1997). Ovariální stimulace u myší také zvyšuje postimplantační úmrtnost a způsobuje déle trvající gestaci. (Beaumont & Smith 1975; Ertzeid & Storeng 1992; Ertzeid *et al.* 1993; Ertzeid & Storeng 2001; Van der Auwera & D'Hooghe 2001).

Některé poruchy gamet způsobené ovariální stimulací mohou být ovlivněny načasováním podávání hormonů, nebo velikostí jejich dávky. Například podle Carella *et al.* (2007) množství polyploidických myších embryí po ovariální stimulaci a *in vivo* či *in vitro* oplození je ovlivněno časem, ve kterém byl PMSG podán (ráno vs. odpoledne). Maundlin a Fraser (1977) zase ukázali, že velikost dávky má vliv na polyspermii a tím polyploidii (díky změnám na membráně), ale ne na aneuploidii. Incidence aneuploidie je výrazně odlišná v závislosti na použitém kmeni – vyšší je u inbredních než u nešlechtěných kmenů (Luckett & Mukherjee 1986).

4.2.2. hMG + hCG

Stimulace lidským menopauzálním gonadotropinem, obsahujícím jak FSH, tak LH, vede dle očekávání také k ovariální hyperstimulaci. Oproti PMSG se hMG považuje za více čistou a přesně definovanou hormonální směs (Brooke *et al.* 2007).

Administrace probíhá stejně jako u PMSG. Někteří autoři uvádí aplikaci hMG dvakrát, 24 hodin po sobě, první a druhý den (Brooke *et al.* 2007), z důvodu nestálosti

suspenze, avizované výrobcem. Jiní (Emadi & Salehnia 2004) aplikují pouze jednou. Relevance výsledků a porovnatelnost efektivity tohoto protokolu je tím zmenšena, i když se dá říci, že poskytuje procentuálně stejné množství pre-zygotických embryí jako PMSG.

Případný negativní vliv tohoto protokolu na kvalitu získaných embryí nebyl zatím publikován, pouze Brooke *et al.* (2007), který zkoumal vhodnost pre-zygotických stádií získaných z takto stimulovaných CBA myši pro mikromanipulační techniky při produkci transgenních jedinců, uvádí neschopnost embryí pokračovat ve vývoji v recipientní samici. Tento jev vysvětluje možnou disbalanci v regulaci oocytární maturace, nebo přítomností mitogenních faktorů.

4.2.3. Čistý FSH (či jeho analogy) + hCG

Dalším možným způsobem ovariální stimulace je podávání čistého FSH pro indukci multifolikulárního růstu a poté hCG pro ovulaci. Důvodem relativně velkého zájmu o tuto metodu a její dopady nejsou ani tak výrazně lepší výsledky po její aplikaci oproti ostatním (i když některé komparativní studie s analogy rhFSH vs. PMSG u myši toto ukazují – např. Munoz *et al.* 1993), ale její masové používání u lidí a tím nutnost dokonalého poznání možných následků např. na kvalitu získaných gamet.

Díky relativně krátkému biologickému poločasu FSH je pro opravdu výrazné zvýšení množství dozrálých folikulů nutné podávat hormon častěji než PMSG, případně (hlavně u potkanů) kontinuální infuzární administrací hormonu (Armstrong & Opavsky 1988). To činí metodu výrazně dražší, laboratorně náročnější a tím i méně používanou jako nástroj pro získání gamet. Řešením se zdá být vývoj hormonů, které mají díky umělým glykosylacím výrazně delší biologický poločas, a například u myši kmene C57B1/6J vykazují při jedné aplikaci výsledky srovnatelné s opakovaným podáním rhFSH (Ruman *et al.* 2005) i výrazně vyšší (Rhonda *et al.* 2009).

4.2.3.1. Příklad protokolu rhFSH/hCG u C57B1/6 x CBA myši

Administrace, uváděná v tomto případě je převzatá od Edwards *et al.* 2004 s dávkami, které vykazovaly nejlepších výsledků. Myši byly chovány pod standardními podmínkami s časovým rytmem 14 hodin světla/10 hodin tmy.

1. den – 14:00 10 IU rhFSH s.c.

2. den – 14:00 10 IU rh FSH s.c

3. den – 14:00 5 IU hCG i.p.

Další postup podle záměru, buď okamžité připouštění k samci, nebo po 12-14 hodinách, kdy dochází k ovulaci, odběr oocytů z oviduktů.

4.2.3.2. *Efekty administrace FSH/hCG na embryonální vývoj*

Edwards *et al.*(2004) prokázal negativní vliv administrace rhFSH na kvalitu získaných buněk a jejich raný embryonální vývoj. Zvyšující se dávka hormonu poskytovala zvyšující se počet získaných buněk, ale také rostoucí procento abnormálních zygot. Schopnost vývoje pre-zygotických embryí *in vitro* zde byla oproti kontrolní skupině také výrazně negativně ovlivněna. Munoz *et al.* (1993) nicméně prokázal, že procento defektních embryí je u použití FSH poměrově nižší, než u PMSG.

4.2.4. Použití GnRH agonistů a antagonistů v protokolech

GnRH agonistické a antagonistické hormony jsou využívány převážně v humánní reprodukční medicíně pro lepší kontrolu exogenní stimulace pomocí utlumování produkce endogenních hormonů. Díky tomu, že pro většinu výzkumů jsou zaběhnuté protokoly pro ovariální stimulaci myší dostačující, není přidání většinou drahých GnRH analogů běžné.

Pokud se tyto hormony u myší používají, podávají se nejčastěji intramuskulárně 24 hodin před vlastní superovulací (například eCG a hCG). Jak Kanter *et al.* (2003), tak Coskun & Kanter (2005) v případě GnRH agonistů uvádí výrazně zvýšené množství získaných oocytů. Jejich schopnost oplození a případné dopady na embryonální vývoj myší nicméně nebyly předmětem zkoumání.

4.2.5. Superovulace pomocí administrace antiséra neutralizujícího inhibin

Inhibin je esenciálním hormonem v regulaci sekrece FSH u mnoha živočichů. Vzhledem k jeho fyziologickému působení existuje u mnoha savců zjevná negativní korelace mezi jeho plazmatickou koncentrací a koncentrací FSH (Taya 1993). Snahy o alternativní protokol (z důvodu mnoha již dříve zmíněných problémů s administrací protokolu eCG/hCG) si nemohly této korelace nepovšimnout a vyústily ve vývoj protokolu využívajícího antisérum neutralizující endogenní inhibin. Pomocí této pasivní imunizace již bylo docíleno superovulace u mnoha živočichů jako je potkan (Rivier & Vale 1989), křeček (Kishi *et al.* 1996), kráva (Akagi *et al.* 1997) nebo kůň (Nambo *et al.* 1998).

V roce 2001 vyvinul Wang *et al.* tento protokol také pro pre-pubertální a dospělé myši kmene ddY. Jeho časový rozvrh úplně kopíruje ten pro eCG/hCG, pouze eCG je nahrazeno i.p. injekcí antiséra. Myši byly jinak chovány za standardních podmínek, s denním cyklem 14 hodin světla/10 hodin tmy. Dávky antiséra se pohybovaly od 50 do 400 μ l na zvíře, s nejlepšími výsledky (počet získaných oocytů) u dávky 200 μ l. Všechny pokusné myši byly úspěšně superovulovány a množství získaných oocytů bylo dokonce vyšší, než u kontrolních myší stimulovaných eCG a hCG.

Medan *et al.* v roce 2004 uvedli pro ddY myši protokol, který po vyvolání mnohonásobného růstu folikulů úplně vynechává použití jakéhokoli hormonu spouštějícího ovulaci a využívá pouze fyziologických procesů mezi zvyšující se koncentrací FSH, tím zvyšující se koncentrací estradiolu a díky němu spouštění LH peaku a ovulace.

V obou případech byly získané buňky schopny *in vitro* dosáhnout stadia blastocysty a nebyly u nich pozorovány častější vývojové poruchy, i když by tato možnost měla být ještě podrobena výzkumu.

5. Ovariální stimulace člověka

Asistovaná reprodukce je jednou z velice rychle se rozvíjejících oblastí medicíny, reagující tak na zvyšující se počet párů, které mají problém s početím. Díky velkému množství příčin, které k neplodnosti páru mohou vést, existuje také mnoho způsobů řešení, z nichž většina v určitém kroku zahrnuje ovariální stimulaci. Ať už jde o klasickou metodu *In vitro* fertilizace (IVF), tedy oplození oocytu spermií *in vitro*, nebo Intrauterinní inseminaci (IUI), kdy jsou přečištěné, zahuštěné a kapacitované spermie zaváděny stimulované ženě do dutiny děložní v období ovulace, nebo o léčbu tzv. anovulatorních žen (bez ovulace), jsou vaječníky hormonálně stimulovány k produkci většího množství zralých oocytů. Při embryotransferu (ET) jsou do příjemkyně zaváděny buď její vlastní *in vitro* oplodněná embrya (kombinace IVF-ET), nebo embrya z oplodněných darovaných oocytů. V obou případech musí být příjemkyně také ovariálně stimulována, aby byla její děloha připravena přijmout přenášená embrya.

V této práci je hlavní pozornost zaměřena na ovariální stimulaci v úzkém slova smyslu, to znamená za účelem získání zralých oocytů buď pro dárcovství, nebo pro IVF-ET program. Zmíněna je stimulace vaječníků za účelem indukce ovulace a příprava příjemkyně embrya na embryotransfer z darovaných či kryoprezervovaných oocytů.

Nelze neuvést, že do ovariální stimulace v širším slova smyslu patří bezpochyby také hormonální antikoncepce, významně ovlivňující funkci vaječníků a folikulogenezi. Ta již nicméně výrazně přesahuje rámec této bakalářské práce.

5.2. Obecně o ovariální stimulaci člověka

Všeobecně se ovariální stimulace u lidí liší od té u myši jen málo. Účelem je dozrání co nejvíce oocytů, vyvolání jejich zrání a odběr, k čemuž se používá stejných hormonů jako u myši. Při bližším pohledu však narazíme na mnoho rozdílů, daných především nutností pacientky stimulaci a odběr buněk přežít, v mnoha případech i pokračovat v těhotenství po oplození *in vitro* a embryotransferu. Výrazným rozdílem je mnohem větší počet obměn, které se v protokolech mezi sebou mohou objevovat, a to hlavně z důvodu jakési „personalizace“ stimulace, která by měla být vždy upravena podle potřeb každé jednotlivé pacientky. Každá stimulace podléhá v celém svém průběhu přísné kontrole

a například dávky hormonů jsou upravovány podle výsledků krevních rozborů a ultrazvuku. Pokud jakékoli hodnoty napovídají např. vzniku hyperstimulačního syndromu, je stimulace okamžitě přerušena.

Podoba procesu, kterým musí pacientka při ovariální stimulaci projít je závislý na typu léčby neplodnosti daného páru. Všeobecně se ovšem dá říci, že se skládá z několika stupňů – testování ovariální rezervy, podle které se v první řadě určuje použitý protokol, vlastní administrace hormonů společně s pravidelnou kontrolou a odběr oocytů.

5.3. Testování (screening) ovariální rezervy

Tzv. ovariální rezerva je termín hodnotící počet oocytů, které jsou vaječníky schopny do konce reprodukčního věku ženy poskytnout. Její otestování je zásadní pro předpověď výsledků ovariální stimulace i výběr správného protokolu. Jak kvantita, tak kvalita oocytů v rezervě výrazně ovlivňuje konečný výsledek IVF – u žen starších 40 let jsou úspěchy programu nižší, i pokud mají v rezervě stále velké množství oocytů, ty jsou totiž již nízké kvality. Naopak u mladých žen s omezenou rezervou jsou výsledky IVF lepší, protože nižší množství získaných oocytů je vyrovnáno jejich výbornou kvalitou (Gardner 2006)

Pro její určení a otestování je nutné zhodnotit několik faktorů. Hlavním z nich je věk ženy, se kterým kvalita i počet oocytů ve většině případů klesá. Pasivně měřitelnými endogenními faktory ovlivňujícími rezervu jsou například bazální koncentrace FSH, délka folikulární fáze (Scheffer *et al.* 1999; Erdem *et al.* 2002), množství antrálních folikulů viditelných na ultrazvuku (Morris *et al.* 2002), koncentrace inhibinu, estradiolu či AMH.

Koncentrace estradiolu E2 v plazmě 3. den cyklu je spojena jak se zmenšenou ovariální rezervou, tak i s polycystickým ovariálním syndromem (PCOS), proto se pro měření rezervy používá ve spojení s FSH testem (Ranieri *et al.* 1998; Fanchin *et al.* 1994). Úloha AMH jako prediktivního markeru výsledků IVF byla objevena teprve nedávno (Seifer *et al.* 2002) a tento hormon se stal velkým příslibem pro zlepšení programů asistované reprodukce.

Velice často jsou pro testování rezervy používány provokativní testy exogenními hormony, jako např. FSH test ovariální rezervy (Fanchin *et al.* 1994), stimulační test GnRH agonistou (Winslow *et al.* 1991) či stimulační test klomifen-citrátem (Navot *et al.* 1987).

5.4. Metodika ovariální stimulace

5.4.1. Používané hormony

Hormony používané pro stimulaci lidí se nijak neliší od těch, používaných u myší (viz výše). Nejčastěji se v dnešní době objevují GnRH agonisté a antagonisté, FSH (urinární i rekombinantní), hMG a hCG. Již ne zcela obvyklým, nicméně v minulosti nepostradatelným hormonem pro indukci ovulace a ovariální stimulaci je klomifen-citrát.

GnRH agonisté – (nejčastěji busorelin acetát, nafarelin acetát) jsou používáni buď pro okamžité navýšení koncentrace FSH a LH v plazmě, díky prvotní stimulaci hypofýzy (ultrakrátký a krátký protokol), nebo pro utlumení produkce endogenních gonadotropinů pomocí tzv. *down*-regulace a tím eliminace jejich vlivu na exogenní stimulaci a ovulaci (dlouhý a krátký protokol). Podávají se buď subkutánně, nebo inhalačně jako nosní sprej.

GnRH antagonisté – (nejčastěji cetorelix, ganirelix) jsou uměle vytvořené analogy GnRH, které kompetitivně blokují receptory na adenohipofýze, čímž snižují sekreci LH a FSH po dobu 8 hodin (Reissmann *et al.* 1995). Jsou neustále měněny a zlepšovány, ty dnes používané byly registrovány v roce 2001 (Fauser & Devroey 2005). Mohou být podávány kdykoli v průběhu folikulární fáze a poskytují inhibici LH a FSH na dobu závislou na velikosti dávky.

Klomifen-citrát – je modulátor estrogenového receptoru, vážící se na něj a blokující tak působení estrogenu. Díky potlačení negativního působení estrogenu na hypotalamo-hipofyzární osu stimuluje produkci FSH a LH. Nezabraňuje předčasné ovulaci.

Gonadotropiny – pro lidskou ovariální stimulaci se stejně jako pro myší využívá hMG jako směsi FSH a LH v poměru 1:1, a FSH, který může být buď přečištěný urinární, nebo rekombinantně vytvořený. Vysoce přečištěný FSH se izoluje pomocí specifických protilátek a byl vytvořen hlavně z důvodu eliminace kontaminace neaktivními proteiny, které tvořily až 95% hMG (Macklon *et al.* 2006) a eliminace hypersenzitivních reakcí.

Chimerický recFSH-CTP je alternativou k čistým FSH. Díky prodlouženému biologickému poločasů jsou jeho nutné dávky výrazně sníženy oproti recFSH bez nežádoucích účinků (Bouloux *et al.* 2001; Duijkers *et al.* 2002)

5.4.2. Jednotlivé protokoly administrace

5.4.2.1. Dlouhý protokol GnRH agonista/FSH

Tzv. dlouhý protokol je v dnešní době nejčastěji používaným způsobem ovariální stimulace u bezrizikových pacientek s normální předchozí reakcí. Využívá schopnosti GnRH při dlouhodobém používání utlumit osu hypotalamus-hypofýza, a tedy eliminovat vlivy endogenního LH a FSH. Následná stimulace FSH poté vyvolává multifolikulární růst a hCG zrání. Dávky hormonů jsou závislé na věku, body mass indexu (BMI), bazální hodnotě FSH a předchozích výsledcích testování ovariální rezervy pacientky.

GnRH analog je podáván buď od začátku menstruačního cyklu, nebo od ovulace předchozího cyklu, neboli takzvaně z folikulární nebo luteální fáze (MacLachlan et al. 1989; Urbancsek & Witthaus 1996) přibližně 14 dní. Pokud jsou po této době zjištěny dostatečně nízké hodnoty hormonů (E2, LH, progesteron) (Gardner et al. 2006), začíná se souběžným podáváním FSH denními injekcemi po dobu přibližně osmi dní, po kterých se aplikuje hCG a 36 hodin nato se oocyty odebírají. Přesná doba podání hCG je závislá na výsledku ultrazvukového vyšetření (alespoň 3 folikuly 17-20mm v průměru) a stoupajících hodnotách E2 v plazmě.

Nevýhodami jsou především vyšší cena, způsobená větším množstvím podaných hormonů a dlouhá administrace, která pro pacientku znamená určité nepohodlí. Co se týče úspěšnosti protokolu vůči ostatním, existuje mnoho studií prokazujících jeho výhody, ať už v úspěšnosti IVF programu, počtu získaných folikulů či implantačním poměru (Bo-Abbas *et al.* 2001; Marcus & Ledger 2001; El-Nemr *et al.* 2002; Tasdemir *et al.* 1995), ale i takové, které rozdíl v úspěšnosti mezi krátkým a dlouhým protokolem neprokázaly (Ravhon *et al.* 2000; Hughes *et al.* 1992). I přes to se v poslední době stal dlouhý protokol tzv. zlatým standardem, nejpoužívanějším způsobem ovariální stimulace pro IVF a dárcovství.

5.4.2.2. Krátký protokol GnRH agonista/FSH

Typicky je krátký protokol ordinován pacientkám s vysokou bazální hladinou FSH, nebo těm, které při předchozí stimulaci dlouhým protokolem vykazovali špatnou odpověď. Využívá obou efektů GnRH agonistů – jak počátečního stimulačního, tak následného tlumícího efektu.

GnRH agonista se podává od druhého dne cyklu, FSH od třetího dne cyklu až do přibližně jedenáctého dne cyklu. Na konci administrace se kontroluje ultrazvukem počet vzrostlých folikulů a hladina estrogenů a progesteronů v krvi a podle toho se určuje přesný čas podání hCG.

Největší nevýhodou tohoto protokolu je vysoká hladina progesteronu v průběhu folikulární fáze. To je způsobeno pravděpodobně udržením corpus luteum z předchozího cyklu. Pokud jeho koncentrace přesahuje hranici 6 mmol/L ve folikulární fázi, je doporučováno stimulaci ukončit (Gardner 2006). Jeho výhodou je nižší cena a kratší doba trvání administrace hormonů.

Někdy se používá tzv. ultrakrátký protokol, u kterého jsou dávky GnRH zredukovány pouze na dvě na začátku cyklu, čímž se využije jejich stimulačního účinku, a poté už jsou podávány pouze gonadotropiny (FSH, méně často hMG). Tento protokol se používá v případech pacientek s velice nízkou předchozí reakcí na stimulaci, ovšem kvůli nemožnosti kontrolovat přesný okamžik ovulace je používán spíše výjimečně.

5.4.2.3. Protokol s použitím GnRH antagonisty

Díky své praktičnosti, nižším dávkám hormonů a jen minimálně sníženému množství získaných oocytů (Fluker *et al.* 2001) se tento protokol rychle stal alternativou ke klasickému dlouhému GnRH agonistickému protokolu. Firouzabadi *et al.* (2010) ukazuje, že hladina sérového estradiolu, množství použitých gonadotropin a incidence OHSS jsou tu tohoto typu protokolu mnohem nižší, než u klasického dlouhého s GnRH agonisty

Díky své schopnosti v jakémkoli okamžiku blokovat produkci gonadotropinů hypofýzou až na 8 hodin může být GnRH antagonist s rychlým nástupem účinku aplikován kdykoli v průběhu folikulární fáze. Většinou se podává uprostřed stimulace, ne před jejím začátkem, jako GnRH agonista. Pro jeho využití v zabránění předčasného nástupu ovulace byly vyvinuty dva přístupy – tzv. single-dose a multiple-dose protokol. U single-dose protokolu se aplikují dvě injekce 5 mg cetrorelixu, jedna 7. den stimulace FSH, druhá 48 hodin poté (Frydman *et al.* 1991), další den dochází k aplikaci hCG. U multiple-dose protokolu jsou malé dávky (0,25 mg) agonisty podávány od 6. dne administrace FSH každodenně až do podání hCG. Mezi výsledky (úspěšné IVF) těchto protokolů není statisticky významný rozdíl (Olivennes *et al.* 2003).

Kvůli velice nízkým hodnotám koncentrace LH v průběhu stimulace se někdy u tohoto protokolu doporučují malé dávky hCG nebo rekombinantního LH (Filicori *et al.* 2002).

5.4.2.4. Protokol s použitím klomifen-citrátu a FSH/hMG

Před zavedením GnRH analogů do praxe byl nejpreferovanějším protokolem ten obsahující klomifren-citrát. Jeho výhodami jsou hlavně nižší spotřeba hMG a vyšší koncentrace progesteronu v luteální fázi, která nahrazuje suplementaci v tomto období (Messinis & Milingos 1998). Nahrazen byl převážně z důvodu časté předčasné ovulace. V centrech asistované reprodukce se dnes používá hlavně u pacientek, které na něj adekvátně reagovaly v minulosti, u nezdůvodněných anovulací či u těch, které si nepřejí být stimulovány s GnRH agonisty. Pro svou výrazně nižší cenu, délku trvání a nižší počet dosažených oocytů bývá někdy označován jako protokol minimální (Dostál *et al.* 2005)

Nejčastěji je klomifen-citrát podáván od 2. dne cyklu a pokračuje 5 dní. hMG administrace začíná 3. den a pokračuje, dokud není dominantní folikul 17-19mm v průměru a sérová hladina E2 estradiolu nedosáhne hranice 1800 pmol/L.

5.4.2.5. Stimulace příjemkyně ebmryí

Ovariální stimulace se provádí také v případě přípravy děložní sliznice na oplození embryem. Tento případ nastává, pokud si žena při předchozích IVF cyklech nechala nepoužitá embrya kryopreservovat a nyní je chce použít, případně u žen, které musí použít oocyty darované. Pro mnoho párů, u kterých žena buď neprodukuje oocyty vůbec, nebo jsou špatné kvality, případně je žena přenašečkou dědičného onemocnění, je jedinou šancí na otěhotnění embryotransfer z darovaných oocytů oplodněných spermiemi manžela. Příjemkyně musí být v tomto případě ovariálně nastimulována tak, aby byla děložní sliznice schopna přijmout a vyživovat embryo.

Příjemkyně musí před vstupem do tohoto programu absolvovat tzv. zkusmý cyklus, který testuje, zda je její děloha schopna vytvořit sliznici vhodnou k přijetí a uhníždění transferovaných zárodků. Tento zkusmý cyklus sestává z podávání postupně se zvyšující dávky syntetických estrogenů po dobu 14 dnů, po kterých následuje ultrazvukové měření

výšky děložní sliznice a případná úprava administrace. Pokud je odpověď adekvátní, následuje po tomto zkusmém cyklu již cyklus léčebný.

Léčebná stimulace se liší podle toho, zda pacientka za normálních okolností menstruuje, či nikoliv. U menstruuujících žen s pravidelným cyklem je podán před začátkem cyklu GnRH analog pro eliminaci vlivů endogenních hormonů na výsledek stimulace a poté následuje administrace estrogenů, stejně jako ve zkusmém cyklu. Opět je po 14 dnech provedena UZ kontrola odpovědi děložní sliznice, a pokud ta reaguje podle očekávání, je příjemkyně připravena na embryotransfer. Během této doby je dárkyně synchronizovaně stimulována a po odběru oocytů dochází k oplození *in vitro*. Příjemkyni se začíná podávat progesteron jako příprava sliznice na těhotenství. Po kultivaci embryí dochází k embryotransferu, po kterém příjemkyně do ověření těhotenství stále aplikuje jak estrogeny, tak progesteron. Následuje podpůrná hormonální administrace v průběhu těhotenství.

U žen bez menstruačního cyklu je nejdříve vyvolána menstruace, po níž okamžitě následuje léčba estrogeny, a to jak v zkusmém, tak v léčebném cyklu.

Embryotransfer vykazuje lepší procentuální výsledky těhotenství než klasický IVF program, hlavně z toho důvodu, že darované oocyty jsou od mladých, zdravých a přísně zdravotně kontrolovaných žen, čímž je zaručena jejich vysoká kvalita (Gardner *et al.* 2006; <http://www.reprofit.cz/page.php?id=64&lang=cz>)

5.5. Odběr oocytů (Ovum pick-up, OPU)

Dozrálé oocyty se odebírají nejlépe 34-38 hodin po administraci hCG (Bjercke *et al.* 2000). U člověka probíhá odběr operačně, transvaginální punkcí oocytů z ovariálních folikulů dutou jehlou pod ultrazvukovou kontrolou. Zákrok se provádí v celkové, nebo lokální anestezii, analgezii či s použitím elektroakupunktury. Výběr metody sedace se liší podle pracoviště a místních zkušeností, na množství odebraných oocytů a subjektivní vnímání bolesti pacientkami nemá výběr vliv (Gejervall *et al.* 2005). Trend v aplikaci lokální anestezie je podmíněn hlavně její nižší cenou a menšími možnostmi komplikací.

Po uspání pacientky se vaginální oblast vyčistí solným roztokem pro zabránění případným znečištěním. Pod ultrazvukovou sondou se zavádí dutá jehla (v dnešní době pomalu nahrazovaná nově vyvinutou, tzv. J- jehlou (Lavery *et al.* 2008), která se přes zadní klenbu poševní dostává k vaječnům, postupně propichuje jednotlivé Graafovy folikuly a vysává z nich folikulární tekutinu. Díky expanzi kumulu, a tedy rozvolnění buněk cumulus

oophorus od folikulární stěny, je proudem tekutiny do jehly strhnut i COC. Folikulární tekutina je okamžitě embryologicky zkoumána na přítomnost COC.

Alternativou k vysávání tekutiny je proplachování folikulů. I přes výzkumy ukazující, že se touto metodou dosahuje většího procenta úspěšně získaných oocytů (Bagtharia & Haloob 2005), většina autorů ji nepřikládá výraznější výhody a díky náročnějšímu, delšímu a dražšímu postupu nepatří mezi metody klasicky používané (Gardner 2006; Kingsland *et al.* 1991).

Mezi možné komplikace při odběru oocytů patří intraperitoneální krvácení, zranění pánevních orgánů jehlou, krvácení, zanícení břišní dutiny, puknutí endometriálních cyst i osteomyelitida (Gardner 2006; El-Shawarby *et al.* 2004)

5.6. Možné komplikace stimulace a nepříznivé efekty na kvalitu buněk

5.6.1. Vedlejší efekty a komplikace ovariální stimulace na pacientku

Ovariální stimulace může samozřejmě vyústit v mnoho negativních následků. Pacientkami nejčastěji uváděné obtíže jsou spojené spíše s nepohodlím, než závažnými zdravotními komplikacemi – mezi takové patří například změny hmotnosti, nestálá nálada, bolest prsou, tlak v podbřišku a problémy se zažíváním (Macklon 2006). Mezi závažné a život ohrožující komplikace stimulace patří hyperstimulační syndrom (OHSS, Ovarian Hyperstimulation Syndrome) a venózní tromboembolismus.

OHSS (ovariální hyperstimulační syndrom) je nejzávažnější a život ohrožující komplikací při ovariální stimulaci, kdy vaječníky reagují na stimulaci tak výrazně, až reakci považujeme za patologickou. Je charakterizován enormním zvětšením vaječníků, vysokými hodnotami koncentrace estrogenů a hyperpermeabilitou kapilár, vedoucí k akumulaci tekutiny v extravaskulárním prostoru a v dutinách. V některých případech se objevuje také hypotenze, zvýšená srážlivost krve, poruchy vylučování a dýchání (Aboughar & Mansour 2003; Marek & Machač 2003), které mohou v těžkých případech končit i smrtí.

Zvýšená rizika vzniku OHSS vykazují pacientky se syndromem polycystických vaječníků, astenického vzhledu či velmi mladé, vliv na jeho rozvoj má především podaná dávka hCG, typ použitého protokolu - například použití GnRH agonistů riziko zvyšuje (Nuggent *et al.* 2000) – a další průběh těhotenství.

Vzhledem k faktu, že přesný řetězec dějů, vedoucích k jeho vzniku není znám, je nejúčinnější obranou prevence a v případě vzniku onemocnění symptomatická léčba. Prevencí se rozumí posouzení stavu pacientky a vybrání správného protokolu, přísná kontrola hladiny estrogenů v průběhu stimulace a ultrazvuková vyšetření, monitorující případný nadměrný růst.

Venózní tromboembolismus je vzácnou komplikací, která se objevuje v 1,6 případech na 100 000 cyklů (Grandone *et al.* 2004) a je většinou spojena s předchozí predispozicí (Stewart *et al.* 1997). Zvýšená hladina estrogenů a srážlivosti krve vede ke vzniku trombóz hlubokých žil. Většinou se objevuje společně s OHSS.

5.6.2. Vedlejší efekty ovariální stimulace na kvalitu získaných oocytů a ovariální funkci

Přestože u myši existuje mnoho důkazů o negativním vlivu administrace exogenních hormonů na kvalitu získaných buněk a jejich embryonální vývoj, u člověka je těchto dat mnohem méně. To je zřejmě zapříčiněno mnohem menším počtem oocytů, které jsou k dispozici pro výzkum *in vitro*. Pokud takovéto studie existují, neuvádí žádné negativní následky ovariální stimulace na kvalitu embryí (NG *et al.* 2003; Ziebe *et al.* 2004).

Naopak existuje mnoho důkazů o ovlivnění edometriální tkáně a její schopnosti přijmout embryo. Velmi křehká rovnováha mezi endokrinními a parakrinními faktory je snadno porušena, primárně vysokými hladinami estrogenu. Mezi mechanismy, kterými může ovariální stimulace ovlivnit endometrium patří přímý efekt GnRH agonistů, porušení endokrinologie časně folikulární fáze, nesprávné načasování injekce hCG ke spuštění ovulace a neadekvátní podpora luteální fáze (Macklon *et al.* 2006).

Již od začátků používání ovariální stimulace je jasné, že ovlivňuje luteální fázi a funkci corpus luteum (Edwards *et al.* 1980; Macklon *et al.* 2006). Tato skutečnost je eliminována hormonální podporou i po odběru oocytů pomocí hCG, estrogenů či malými dávkami GnRH agonistů (Pirard *et al.* 2005).

6. Závěr

Přínos optimalizace ovariální stimulace myši jako techniky získávání velkého množství kvalitních oocytů či embryí je nepopiratelný. Administrační protokoly, shrnuté v této práci, ukazují možnosti alternativního výběru, které laboratoře mají a porovnává je na základě praktičnosti, efektivity a kvality získaných buněk.

Tzv. „zlatým standardem“ v stimulaci myší je podávání PMSG k vyvolání multifolikulárního růstu a hCG k indukci ovulace. Tato možnost je preferována z důvodu relativně nízké ceny hormonů, jejich snadné aplikaci (intraperitoneální) a velkého množství získaných samičích pohlavních buněk u většiny obvyklých myších kmenů. Nevýhodami jsou výrazné individuální rozdíly v reakcích (i v rámci jednoho kmene) a vedlejší negativní efekty odrážející se na kvalitě získaných oocytů a embryí, i na jejich pozdějším raném embryonálním vývoji. Tyto negativní efekty jsou připisovány dlouhé biologické aktivitě PMSG, vyvolávající nestabilitu v koncentracích estrogenu a progesteronu v těle, a jeho vysoké luteinizační aktivitě.

Zjištěné negativní účinky hormonálních složek s luteinizační aktivitou vedly k izolaci a purifikaci FSH hormonu z moči. Čistota a dokonalá kontrolovatelnost složení hormonu se ještě zvýšila s jeho výrobou *in vitro*. Ovšem krátký biologický poločas FSH způsobuje nutnost časté, případně kontinuální administrace, což metodu činí dražší a laboratorně náročnější než je ta s PMSG. Řešením se zdají být chimerické a upravené molekuly FSH s prodlouženou aktivitou. Podání FSH s hCG nicméně nezvyšuje výrazně množství získaných oocytů ani jejich kvalitu (a to i při podání chimerických FSH molekul s prodlouženou aktivitou). Vysoká luteinizační schopnost a dlouhý biologický poločas proto zjevně nejsou jedinými faktory, které negativní efekty na kvalitu vyvolávají.

Alternativními metodami jsou stimulace s použitím hMG/hCG, antiséra neutralizujícího inhibin a GnRH analogů. hMG je směs obsahující FSH i LH, tedy se stejnou aktivitou jako je PMSG, získávaná z moči posmenopauzálních žen. Ovariální stimulace tímto hormonem je stejně efektivní jako ta s PMSG, ale kvalita získaných pre-zygotických embryí je diskutabilní. Neutralizace inhibinu jako způsob stimulace je novým protokolem, snažícím se řešit problém negativních vlivů PMSG na kvalitu buněk. Navržené protokoly jsou zatím funkční pro kmen ddY a získaná pre-zygotická stadia jsou schopná dosáhnout blastocysty, tento protokol se tak stává příslibem do budoucna.

U člověka prošly metody ovariální stimulace dlouhým vývojem, který vyústil v dnes používané protokoly, obsahující nejčastěji GnRH agonistu, FSH a hCG. Výběr protokolu je závislý na specifických vlastnostech jednotlivé pacientky, jejích odezvách a je jí přizpůsobován na míru. Nejčastěji se aplikuje tzv. dlouhý protokol s GnRH agonistou, snižujícím sekreci FSH a LH hypofýzou několik dní před začátkem podávání FSH, nebo krátký protokol, využívají FSH a rychlého zvýšení a posléze snížení produkce gonadotropinů GnRH. Novou alternativou je použití GnRH antagonisty, který endogenní produkci hormonů snižuje okamžitě a nevyžaduje tedy dlouhodobou administraci, jako GnRH agonisté.

U obou typů ovariální stimulace, jak lidské, tak myší, je tedy zásadní optimalizace protokolu, která u myší zahrnuje především zacílení administrace na určitý kmen, světelné podmínky a typ hormonů, u lidí pak zhodnocení stavu konkrétní pacientky, výběr vhodného schématu a přísná kontrola průběhu, umožňující změny v závislosti na intenzitě reakce.

Tato práce současné protokoly pro ovariální stimulaci myší i lidí shrnuje v souvislostech s ovariální fyziologií, nabízí alternativy a jejich porovnání, a nastiňuje postup procesů, které jsou při stimulaci použity. Pokud pomůže čtenáři s návrhem pokusu, objasní pacientce budoucí proceduru, či jen způsobí nadšení pro věc a dá směr budoucí práci, tak jako se to stalo autorce, budou její cíle dokonale splněny.

7. Použitá literatura

Armstrong, D.T., and Opavsky, M.A. (1988). Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 39, 511-518.

Bahtharia, S., Haloob, AR. (2005) Is there a benefit from routine follicular flushing for oocyte retrieval? *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 25(4):374-6.

Beaumont, H.M., and Smith, A.F. (1975). Embryonic mortality during pre-implantation and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 45, 437-&.

Birken, S., Maydelman, Y., Gawinowicz, M.A., Pound, A., Liu, Y.P., and Hartree, A.S. (1996). Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 137, 1402-1411.

Bjercke, S., Tanbo, T., Dale, P.O., and Abyholm, T. (2000). Comparison between two hCG-to-oocyte aspiration intervals on the outcome of in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17, 319-322.

Bo-Abbas, Y.Y., Martin, K.A., Liberman, R.F., Cramer, D.W., and Barbieri, R.L. (2001). Serum and follicular fluid hormone levels during in vitro fertilization after short- or long-course treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertility and Sterility* 75, 694-699.

Booth, R.A., Weltman, J.Y., Yankov, V.I., Murray, J., Davison, T.S., Rogol, A.D., Asplin, C.M., Johnson, M.L., Veldhuis, J.D., and Evans, W.S. (1996). Mode of pulsatile follicle-stimulating hormone secretion in gonadal hormone-sufficient and -deficient women - A clinical research center study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 81, 3208-3214.

Bouloux, P.M.G., Handelsman, D.J., Jockenhovel, F., Nieschlag, E., Rabinovici, J., Frasa, W.L.H., de Bie, J.J., Voortman, G., Itskovitz-Eldor, J., and Grp, F.C.S. (2001). First human exposure to FSH-CTP in hypogonadotrophic hypogonadal males. *Human Reproduction* 16, 1592-1597.

Brooke, D.A., Orsi, N.M., Ainscough, J.F.X., Holwell, S.E., Markham, A.F., and Coletta, P.L. (2007). Human menopausal and pregnant mare serum gonadotrophins in murine superovulation regimens for transgenic applications. *Theriogenology* 67, 1409-1413.

Carrell, D.T., Liu, L.H., and Christensen, G. (2007). Polyploidy in mouse embryos derived from in vivo and in vitro fertilization is dependent on the timing of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) injection. *Fertility and Sterility* 87, 1470-1472.

Champlin, A.K., Kuzia, S.J., Rice, B.A., and Mobraaten, L.E. (1987). Cell surface characteristics of blastocysts from spontaneously ovulating and gonadotropin treated mice. *Biology of Reproduction* 36, 439-444.

- Clarke, H.G., Hope, S.A., Byers, S., and Rodgers, R.J. (2006). Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction* 132, 119-131.
- Cole, L.A. (2009). New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7, 37.
- Creus, S., Pellizzari, E., Cigorruga, S.B., and Campo, S. (1996). FSH isoforms: Bio and immuno-activities in post-menopausal and normal menstruating women. *Clinical Endocrinology* 44, 181-189.
- Dekel, N., Lewysohn, O., Ayalon, D., and Hazum, E. (1988). Receptors for gonadotropin releasing hormone are present in rat oocytes. *Endocrinology* 123, 1205-1207.
- Depamphilis, M.L., Herman, S.A., Martinezsalas, E., Chalifour, L.E., Wirak, D.O., Cupo, D.Y., and Miranda, M. (1988). Microinjecting into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. *Biotechniques* 6, 662-&.
- Dostál J, Březinová J, Svobodová M. Minimální stimulace v programu IVF/ICSI +ET. *Praktická gynekologie* 2005;9(2).
- Edwards, L.J., Kind, K.L., Armstrong, D.T., and Thompson, J.G. (2005). Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 288, E845-E851.
- Edwards, R.G., Steptoe, P.C., Purdy, J.M. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 87(9):737-56.
- El-Nemr, A., Bhide, M., Khalifa, Y., Al-Mizyen, E., Gillott, C., Lower, A.M., Al-Shawaf, T., and Grudzinskas, J.G. (2002). Clinical evaluation of three different gonadotrophin-releasing hormone analogues in an IVF programme: a prospective study. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 103, 140-145.
- Elbling, L., and Colot, M. (1985). Abnormal development and transport and increased sister chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice. *Mutation Research* 147, 189-195.
- Elvin, J.A., Yan, C.N., and Matzuk, M.M. (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 159, 1-5.
- Elvin, J.A., Yan, C.N., Wang, P., Nishimori, K., and Matzuk, M.M. (1999). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology* 13, 1018-1034.
- Eppig, J.J., Wigglesworth, K., Pendola, F., and Hirao, Y. (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction* 56, 976-984.

- Erdem, A., Erdem, M., Biberoglu, K., Hayit, O., Arslan, M., and Gursoy, R. (2002). Age-related changes in ovarian volume, antral follicle counts and basal FSH in women with normal reproductive health. *Journal of Reproductive Medicine* 47, 835-839.
- Erickson, G.F., and Shimasaki, S. (2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11, 193-198.
- Ertzeid, G., and Storeng, R. (1992). Adverse effects of gonadotropin treatment on preimplantation and postimplantation development in mice. *Journal of Reproduction and Fertility* 96, 649-655.
- Ertzeid, G., and Storeng, R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction* 16, 221-225.
- Ertzeid, G., Storeng, R., and Lyberg, T. (1993). Treatment with gonadotropins impaired implantation and fetal development in mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 10, 286-291.
- Fanchin, R., Deziegler, D., Olivennes, F., Taieb, J., Dzik, A., and Frydman, R. (1994). Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (Efort) – a simple and reliable screening test for detecting poor responders in in vitro fertilization. *Human Reproduction* 9, 1607-1611.
- Fares, F.A., Sukanuma, N., Nishimori, K., Lapolt, P.S., Hsueh, A.J.W., and Boime, I. (1992). Design of a long acting follitropin agonist by fusing the c-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4304-4308.
- Fausser, B., and Devroey, P. (2005). Why is the clinical acceptance of gonadotropin-releasing hormone antagonist cotreatment during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization so slow? *Fertility and Sterility* 83, 1607-1611.
- Filicori, M., Cognigni, G.E., Samara, A., Melappioni, S., Perri, T., Cantelli, B., Parmegiani, L., Pelusi, G., and DeAloysio, D. (2002). The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction. *Human Reproduction Update* 8, 543-557.
- Firouzabadi, R.D., Ahmadi, S., Oskouian, H., and Davar, R. (2010). Comparing GnRH agonist long protocol and gnrh antagonist protocol in outcome the first cycle of ART. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 281, 81-85.
- Fluker, M., Grifo, J., Leader, A., Levy, M., Meldrum, D., Muasher, S.J., Rinehart, J., Rosenwaks, Z., Scott, R.T., Schoolcraft, W., Shapiro, D.B., and Grp, N.A.G.S. (2001). Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertility and Sterility* 75, 38-45.
- Frydman, R., Cornel, C., Deziegler, D., Taieb, J., Spitz, I.M., and Bouchard, P. (1991). Prevention of premature luteinizing hormone and progesterone rise with a gonadotropin releasing hormone antagonist, nal glu, in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertility and Sterility* 56, 923-927.

- Gejervall, A.L., Stener-Victorin, E., Moller, A., Janson, P.O., Werner, C., and Bergh, C. (2005). Electro-acupuncture versus conventional analgesia: a comparison of pain levels during oocyte aspiration and patients' experiences of well-being after surgery. *Human Reproduction* 20, 728-735.
- Ghaemi, S.R., Salehnia, M., and Valojerdi, M.R. (2008). The effect of progesterone and exogenous gonadotropin on preimplantation mouse embryo development and implantation. *Experimental Animals* 57, 27-34.
- Gilbert, Scott F. *Developmental Biology*. 6. vyd. Swarthmore College : Sinauer Associates.
- Grandone, E., Colaizzo, D., Vergura, P., Cappucci, F., Vecchione, G., Lo Bue, A., Cittadini, E., and Margaglione, M. (2004). Age and homocysteine plasma levels are risk factors for thrombotic complications after ovarian stimulation. *Human Reproduction* 19, 1796-1799.
- Gulyas, BJ, Hodgen, GD, Tullner, WW, Ross GT (1977): Effects of fetal or maternal hypophysectomy on endocrine organs and body weight in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with particular emphasis on oogenesis. *Biology of reproduction* 16(2):216-27
- Huang, C.T.F., Weitsman, S.R., Dykes, B.N., and Magoffin, D.A. (2001). Stem cell factor and insulin-like growth factor-I stimulate luteinizing hormone-independent differentiation of rat ovarian theca cells. *Biology of Reproduction* 64, 451-456.
- Hughes, EG., Fedorkow, DM., Daya, S., Sagle, MA., Van de Koppel, P., Collins, JA.(1992) The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility* 58(5):888-96
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., and Tilly, J.L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145-150.
- Kanter, M., Yildiz, C., Meral, I., Koc, A., and Tasal, I. (2004). Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. *Theriogenology* 61, 393-398.
- Kingsland, C.R., Taylor, C.T., Aziz, N., and Bickerton, N. (1991). Is follicular flushing necessary for oocyte retrieval – a randomized trial. *Human Reproduction* 6, 382-383.
- Koh, S.B., Seo, K.S., Kim, S.C., Ahn, B.O., Kim, W.B., and Lee, S.H. (2002). Effect of recombinant human FSH on ovulation, pregnancy and in vitro fertilization in androgen-sterilized mice. *Archives of Pharmacal Research* 25, 357-363.
- Kovalenko, TA., Lakiza, OV., Stefanovych, HV., Baryliak, IR. (1999) The effect of different doses of gonadotropins on the quantitative, morphological and cytogenetic characteristics of oocytes from CBA mice. *Tsitol Genet* 33(1):49-53.
- Kramer, B. (1997). Changes in vascular permeability and deciduoma formation during the peri-implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins. *Anatomical Record* 247, 20-24.

- Kramer, B., Stein, B.A., Van der Walt, L.A. (1990). Exogenous gonadotropins – serum oestrogen and progesterone and the effect on endometrial morphology in the rat. *Journal of Anatomy* 173: 177-86.
- Lavery, S.A., El-Shawarby, S.A., Turner, C., and Trew, G. (2008). The J-Tip Needle-Free Injection System in controlled ovarian hyperstimulation in in vitro fertilization: a pilot study. *Fertility and Sterility* 90, 1969-1972.
- le Cotonnec, J.Y., Porchet, H.C., Beltrami, V., and Munafo, A. (1998). Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part II. Bioavailability of recombinant human luteinizing hormone assessed with an immunoassay and an in vitro bioassay. *Fertility and Sterility* 69, 195-200.
- Legge, M., and Sellens, M.H. (1994). Optimization of superovulation in the reproductively mature mouse. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 11, 312-318.
- Luckett, D.C., Mukherjee, A.B. (1986) Embryonic characteristic in superovulated mouse strains. *Journal of Heredity* 77:39-42
- Macklon, N.S., Stouffer, R.L., Giudice, L.C., and Fauser, B. (2006). The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocrine Reviews* 27, 170-207.
- MacLachlan, V., Besanko, M., O'Shea, F., Wade, H., Wood, C., Trounson, A., Healy, D.L. (1989) A controlled study of luteinizing hormone-releasing hormone agonist (buserelin) for the induction of folliculogenesis before in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine* 11;320(19):1233-7.
- Marcus, S.F., Ledger, W.L. (2001) Efficacy and safety of long-acting GnRH agonists in in vitro fertilization and embryo transfer. *Human Fertility (Cambridge)* 4(2):85-93.
- Matzuk, M.M., Hsueh, A.J.W., Lapolt, P., Tsafiriri, A., Keene, J.L., and Boime, I. (1990). The biological role of the carboxyl terminal extension of human chorionic gonadotropin beta subunit. *Endocrinology* 126, 376-383.
- Maudlin, I., Fraser, L.R. (1977). The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 50(2):275-80.
- McGee, E.A., and Hsueh, A.J.W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21, 200-214.
- Medan, M.S., Wang, H.B., Watanabe, G., Suzuki, A.K., and Taya, K. (2004). Immunization against endogenous inhibin increases normal oocyte/embryo production in adult mice. *Endocrine* 24, 115-119.
- Messinis, I.E., and Milingos, S.D. (1998). Clomiphene in the 21st century. *Human Reproduction* 13, 2362-2365.

- Morris, J.L., Thyer, A.C., Soules, M.C.R., and Klein, N.A. (2002). Antral follicle count by transvaginal ultrasound is reflective of the actual primordial follicle pool. *Fertility and Sterility* 78, 07.
- Munoz, I., Desadia, C.R., Gutierrez, A., Blaquez, M.J., and Pintado, B. (1994). Comparison of superovulatory response of mature outbred mice treated with fsh or pmsg and developmental potential of embryos produced. *Theriogenology* 41, 907-914.
- Munoz, I., Jesus, A.D.N., Josa, A., Espinosa, E., and Gil, I. (1995). Use of follicle stimulating hormone (FSH) to increase the in vitro fertilization (IVF) efficiency of mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 12, 738-743.
- Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J., and Humphrey, W.D. (1984). Variability in gonadotropin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 21, 117-125.
- Navot, D., Rosenwaks, Z., Morgaliot, E.J. (1987) Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet* 19;2(8560):645-7
- Ng, E.H.Y., Lau, E.Y.L., Yeung, W.S.B., and Ho, P.C. (2003). Oocyte and embryo quality in patients with excessive ovarian response during in vitro fertilization treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 20, 186-191.
- Nugent, D., Vandekerckhov, P., Hughes, E., Arnot, M., Lilford, R. (2000) Gonadotrophin therapy for ovulation induction in subfertility associated with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database System Review* CD000410.
- Olivennes, F., Diedrich, K., Frydman, R., Felberbaum, R.E., Howles, C.M.; (2003) Cerotide Multiple Dose International Study Group; Cetrotide Single Dose International Study Group. Safety and efficacy of a 3 mg dose of the GnRH antagonist cetrorelix in preventing premature LH surges: report of two large multicentre, multinational, phase IIIb clinical experiences. *Reproductive biomedicine online* 6(4):432-8.
- Peng, X.R., Hsueh, A.J.W., Lapolt, P.S., Bjersing, L., and Ny, T. (1991). Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 129, 3200-3207.
- Pepling, M.E., and Spradling, A.C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125, 3323-3328.
- Pepling, M.E., and Spradling, A.C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology* 234, 339-351.
- Perlman, S., van den Hazel, B., Christiansen, J., Gram-Nielsen, S., Jeppesen, C.B., Andersen, K.V., Halkier, T., Okkels, S., and Schambye, H.T. (2003). Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 3227-3235.
- Pincus G, Enzmann EV (1935) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *Journal of Experimental Medicine* 62:665-675

- Pirard, C., Donnez, J., and Loumaye, E.L. (2005). GnRH agonist as novel luteal support: results of a randomized, parallel group, feasibility study using intranasal administration of buserelin. *Human Reproduction* 20, 1798-1804.
- Ravhon, A., Lawrie, H., Ellenbogen, A., Lavery, S., Trew, G., and Winston, R. (2000). A prospective, randomized controlled trial comparing the efficacy of recombinant follicle-stimulating hormone in three different in vitro fertilization protocols. *Fertility and Sterility* 73, 908-912.
- Reissmann, T., Felberbaum, R., Diedrich, K., Engel, J., Comaruschally, A.M., and Schally, A.V. (1995). Development and applications of luteinizing hormone releasing hormone antagonists in the treatment of infertility – an overview. *Human Reproduction* 10, 1974-1981.
- Roy, S.K., Wang, S.C., and Greenwald, G.S. (1987). Radioreceptor and autoradiographic analysis of FSH, hCG and prolactin binding sites in primary to antral hamster follicles during the periovulatory period. *Journal of Reproduction and Fertility* 79, 307-313.
- Ruman, J.I., Pollak, S., Trousdale, R.K., Klein, J., and Lustbader, J.Y. (2005a). Effects of long-acting recombinant human follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation on murine folliculogenesis. *Fertility and Sterility* 83, 1303-1309.
- Ruman, J.I., Pollak, S., Trousdale, R.K., Klein, J., and Lustbader, J.Y. (2005b). Effects of long-acting recombinant human follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation on murine folliculogenesis. *Fertility and Sterility* 83, 1303-1309.
- Sasamoto, S., Sato, K., and Naito, H. (1972). Biological active life of PMSG in mice with special reference to follicular ability to ovulate. *Journal of Reproduction and Fertility* 30, 371-&.
- Scheffer, G.J., Broekmans, F.J.M., Dorland, M., Habbema, J.D.F., Looman, C.W.N., and te Velde, E.R. (1999). Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertility and Sterility* 72, 845-851.
- Talbot, P., Shur, B.D., and Myles, D.G. (2003). Cell adhesion and fertilization: Steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biology of Reproduction* 68, 1-9.
- Taya, K. (1993). Role of inhibin in regulation of FSH secretion and folliculogenesis in mammals. *Current Trends in Experimental Endocrinology* 1 97-116
- Tarin, J.J., Perez-Albala, S., and Cano, A. (2002a). Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the mouse. *Molecular Reproduction and Development* 61, 398-405.
- Tarin, J.J., Perez-Albala, S., Gomez-Piquer, V., Hermenegildo, C., and Cano, A. (2002b). Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects pre-implantation embryo development in vitro in the mouse. *Molecular Reproduction and Development* 62, 312-319.

Tasdemir, M., Tasdemir, I., Kodama, H., and Higuchi, M. (1995). Is long protocol gonadotropin releasing hormone agonist administration superior to the short protocol in ovarian stimulation for in vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Menopausal Studies* 40, 25-28.

Trousdale, R.K., Yu, B., Pollak, S.V., Husami, N., Vidali, A., and Lustbader, J.W. (2009). Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertility and Sterility* 91, 265-270.

Ulloaaguirre, A., Midgley, A.R., Beitins, I.Z., and Padmanabhan, V. (1995). Follicle stimulating isohormones – characterization and physiological relevance. *Endocrine Reviews* 16, 765-787.

Urbancsek, J., and Witthaus, E. (1996). Midluteal buserelin is superior to early follicular phase buserelin in combined gonadotropin-releasing hormone analog and gonadotropin stimulation in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 65, 966-971.

Van der Auwera, I., and D'Hooghe, T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reproduction* 16, 1237-1243.

Vansantbrink, E.J.P., Hop, W.C., Vandessel, T., Dejong, F.H., and Fauser, B. (1995). Decremental follicle stimulating hormone and dominant follicle stimulating hormone during the normal menstrual cycle. *Fertility and Sterility* 64, 37-43.

Visser, J.A., de Jong, F.H., Laven, J.S.E., and Themmen, A.P.N. (2006). Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131, 1-9.

Vogel, R., and Spielmann, H. (1992). Genotoxic and embryotoxic effects of gonadotropin hyperstimulated ovulation of murine oocytes, preimplantation embryos and term fetuses. *Reproductive Toxicology* 6, 329-333.

Wang, H., Herath, C.B., Xia, G., Watanabe, G., and Taya, K. (2001). Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. *Reproduction* 122, 809-816.

Wang, M.K., and Zhang, T. (2005). Chronic surgery collection of superovulated oocytes from mouse. *Biology of Reproduction*, 230-230.

Weenen, C., Pena, J.E., Pollak, S.V., Klein, J., Lobel, L., Trousdale, R.K., Palmer, S., Lustbader, E.G., Ogden, R.T., and Lustbader, J.W. (2004). Long-acting follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation exhibited increased bioactivity compared with O-linked analogs in female rats. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 5204-5212.

Winslow, K.L., Toner, J.P., Brzyski, R.G., Oehninger, S.C., Acosta, A.A., and Muasher, S.J. (1991). The gonadotropin releasing hormone agonist stimulation test a sensitive predictor of performance in the flare up in vitro fertilization cycle. *Fertility and Sterility* 56, 711-717.

Yang, B.C., Uemura, T., and Minaguchi, H. (1995). Effects of a gonadotropin releasing agonist on oocyte maturation fertilization and embryonal development in mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 12, 728-732.

Yoshino, O., McMahon, H.E., Sharma, S., and Shimasaki, S. (2006). A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10678-10683.

Zhen, X.M., Qiao, J., Ma, C.H., Fan, Y.H., and Liu, P. (2010). Intraperitoneal bleeding following transvaginal oocyte retrieval. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 108, 31-34.

Ziebe, S., Bangsboll, S., Schmidt, K.L.T., Loft, A., Lindhard, A., and Nyboe Andersen, A. (2004). Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Human Reproduction* 19, 1457-1460.

http://jaxmice.jax.org/manual/breeding_strategies_manual.pdf dostupné online 9.4.2010

<http://www.endotext.org/female/female1/femaleframe1.htm> dostupné online 15.4.2010

<http://www.jfmmu.com/pdf2/200702/200702168.pdf> dostupné online 20.3.2010

<http://www.reprofit.cz/page.php?id=64&lang=cz> dostupné online 12.4.2010

<http://www.ohz.cz/ohzold/Tistene/zpravodajohz09.pdf> dostupné online 25.4.2010