

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta



**Epigenetické a strukturální charakteristiky savčích oocytů a embryí:  
extrapolace pro humánní asistovanou reprodukci (ART)**

Disertační práce

**Alena Langerová**

Školitel: Josef Fulka, Jr.

Praha 2014

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.8. 2014

Alena Langerová

Chtěla bych poděkovat zejména svému školiteli - Josefu Fulkovi, Jr. za vedení v průběhu celé práce, Heleně Fulkové za cenné rady a připomínky k prováděným pokusům. Děkuji vedení GENNETU - Davidu Stejskalovi a Matěji Stejskalovi za to, že mi umožnili a poskytli podmínky k tomu, abych se mohla věnovat daným pokusům. Děkuji celému kolektivu embryologické laboratoře - Vlastimilu Weberovi, Josefu Míkovi, Radomíru Křenovi, Lence Drozdíkové a dalším kolegům za poskytnutí příslušného biologického materiálu. Velké poděkování patří také celé mé rodině a všem přátelům za poskytnutou podporu a zázemí v průběhu celého doktorandského studia.

## **OBSAH**

1. Abstrakt .....	2
2. Úvod .....	4
3. Cíle práce .....	9
4. Komentář a diskuze k jednotlivým publikacím.....	10
5. Závěr .....	28
6. Seznam literatury.....	31
7. Seznam publikací .....	38
8. Prohlášení .....	39
9. Přílohy .....	41

## ABSTRAKT

Před více jak 35 lety (1978) se ve Velké Británii narodila Louise Brownová, první dítě na světě počaté ve zkumavce – *in vitro*. Předpokládá se, že do současné doby je to již více než 4 000 000 dětí.

První snahy o oplození měly úspěšnost kolem 20%, dnes je ale úspěšnost až dvojnásobná (40%). To je výsledkem zavádění nových metod, standardizace manipulačních a kultivačních médií a v neposlední řadě i získáním řady nových poznatků. I přes zavádění nových metod je základním předpokladem úspěchu IVF profesionální práce pracovníků IVF klinik a IVF laboratoře, jejich znalosti v dané oblasti a schopnost posouzení kvality biologického materiálu. Permanentní trénink na nevyužitém biologickém materiálu (nezralé a méně kvalitní oocyty) a jeho využití k výzkumu, by měly být pak základním předpokladem k tomu, aby příslušná IVF centra mohla zavádět další nové progresivní postupy a zkvalitňovat léčbu infertility. I to je navíc předpokladem pro to, aby bylo možné zodpovědět některé otázky z asistované reprodukce, které nejsou dosud zcela jasně vysvětleny.

V prvním okruhu jsme se zaměřili na posouzení kvality oocytů, které byly získány aspirací folikulů po stimulaci vaječníků pacientek gonadotropiny. Pro značení protilátkami proti acetylovaným histonům byly použity pouze oocyty, které se nenacházely ve stádiu metafáze II (MII). Naše výsledky dokazují, že oproti jiným druhům (myš), vykazují kondenzované chromosomy pozitivní stupeň acetylace přibližně u 50%. To je oproti myši 10x vyšší hodnota a mohlo by to naznačovat i korelaci s abnormálně vysokým výskytem aneuploidii (humánní oocyty 50-60% vs. myš 5%).

V druhém okruhu jsme zjišťovali, zda oocyty lidí ve stádiu MI (metafáze I) odpoví na ošetření butyrolactonem 1 (BL 1) stejně jako oocyty myši. Tzn., zda vydělí pólové tělísko a v cytoplasmě se vytvoří pseudo-prvojádro replikující DNA. Takto ošetřené oocyty myši pak dosáhly stádia blastocysty a byly z nich i derivovány linie embryonálních kmenových buněk (ESC). Naše předběžné výsledky ukazují stejnou odpověď humánních oocytů na BL 1. Oocyty vydělily pólové tělísko (75-80%) a v cytoplasmě bylo patrné pseudo-prvojádro s několika jadérky, které replikovalo DNA. Další dělení byla spíše sporadická. Tyto předběžné pokusy budou dále optimalizovány s cílem získat embrya ve stádiu blastocyst a následně linie hESC.

Poslední tématický okruh byl zaměřen na studium funkce atypických jadérek, která se nacházejí v oocytech s dokončeným růstem a v embryích ve velmi časných stádiích dělení. V asistované reprodukci je diskutována práce, kdy je vývojový potenciál zygot predikován podle počtu a distribuce jadérek v prvojádrech. Proč by tomu tak mělo být, nebylo dosud

objasněno. Stejně tak je nezbytné uvést, že řada prací se s tímto hodnocením neztotožnila. Naše výsledky podporují racionální podstatu tohoto hodnocení. Jadérka v zygotách jsou absolutně nezbytná pro transformaci chromatinu po oplození a tím i normální průběh dalšího dělení embrya.

Závěr: naše výsledky jasně dokazují užitečnost studia nadbytečného materiálu z klinik asistované reprodukce a možnost jeho dalšího využití. V našem případě se jednalo o oocyty, které nedosáhly stádia metafáze II v době aspirace z folikulů a ve většině klinik jsou likvidovány. Extrapolace výsledků získaných na laboratorních zvířatech do humánní oblasti pak dokazuje, že je nezbytné se znovu věnovat některým metodám hodnocení zygot s cílem následného využití v humánní asistované reprodukci.

## ÚVOD

Před více jak 35 lety (1978) se ve Velké Británii narodila Louise Brownová, první dítě na světě počaté ve zkumavce – *in vitro*. Předpokládá se, že do současné doby se narodilo s pomocí IVF již více než 4 000 000 dětí, některé prameny udávají dokonce 5 000 000. WHO (Světová zdravotnická organizace) navíc v roce 2009 uznala poruchu plodnosti jako nemoc. Jistě je to jak z důvodů sociálních, kdy ženy odkládají početí dítěte na stále pozdější dobu, ne nepodstatné jsou i faktory biologické. U žen po 35. roce života dochází k dramatickému zlomu ve fertilitě, po 40. roce věku ženy je fertilita problematická. Pokud žena otěhotní, je riziko spontánního potratu 40-50% , zároveň se zvyšuje riziko chromozomálních aberací (Downův syndrom-trizomie 21. chromozomu, Patauův syndrom-trizomie 13. chromozomu, Edwardsův syndrom-trizomie 18. chromozomu). Výše uvedené je dáno kvalitou oocytů. Frekvence aneuploidií u lidských oocytů je velmi vysoká oproti jiným druhům, tj. více než 50% (myš 5%, skot, prase 10%). Příčina vysoké frekvence aneuploidií u humánních oocytů není přesně známa. Dále, u mužů jsou v současné době hodnoty pro normální spermiogram: objem ejakulátu – 1.5 ml; celkový počet spermií  $10^6$ /ejakulát – 39; koncentrace spermií  $10^6$ /ml – 15; progresivní motilita – 32%; vitalita – 58%; morfologie spermií (normální forma) – 4%. Před několika lety by ale byly tyto hodnoty považovány za známku neplodnosti (1). (WHO Laboratory Manual for Semen Analysis, 2010). Není ani dostatečně vysvětleno, co je příčinou uvedeného poklesu.

Narození L. Brownové bylo v dané době považováno za velký vědecký úspěch, který byl oceněn i Nobelovou cenou za lékařství v roce 2010 (Robert Edwards). Současně však i bylo zřejmé, že tento úspěch vyvolá závažné etické a sociální otázky. Jednou z nejčastěji diskutovaných je i ta, jak naložit s nevyužitými embryi.

V prvních pokusech o oplození *in vitro* byly v podstatě oocyty pacientek inkubovány v suspenzi se spermiemi partnera. Daná oblast se však v období 35 let intenzivně rozvíjela, metody jsou mnohem komplikovanější a v mnoha případech i technicky náročnější. Velkým přínosem je komerční produkce médií a dalších využívaných roztoků a substancí, které jsou v laboratořích asistované reprodukce používány. To vede ke standardizaci postupů a možnosti srovnání úspěšnosti jednotlivých klinik. I to se pochopitelně projevuje ve zvýšení efektivity IVF (in vitro oplození, in vitro fertilization).

První snahy o oplození měly úspěšnost kolem 20%, dnes je ale úspěšnost až dvojnásobná (40%). Otázkou však stále zůstává, jaký je přirozený limit, kterého lze dosáhnout. Obecně je uváděna hodnota nad 30%; s ohledem na pravděpodobnost úspěšnosti

při přirozeném oplození *in vivo* u zcela zdravých partnerů za optimálních podmínek (2). Úspěšnost IVF 40% tak může vycházet z toho, že je přenášen větší počet embryí, nebo pak i ze skutečnosti, že po indukci superovulace a následném oplození jsou vybrána jen ta nejlepší embrya (3).

Výše uvedené problémy poklesu plodnosti u lidí vedly zákonitě k vývoji nových postupů, z nichž některé jsou vysoce sofistikované a vyžadují tak i odpovídající vybavení klinik.

Řada postupů je však relativně jednoduchých. Mezi ně patří intracytoplasmatická injekce spermie do oocytů (ICSI – intracytoplasmic sperm injection), kdy je celá spermie i s bičíkem (nebo jen její hlavička – myš) přímo injikována do oocytu. Postup byl již dříve použit u laboratorních (králík) a následně hospodářských zvířat (skot). Stejně tak se ale ukázal být efektivní i u lidí a v roce 1992 došlo k narození prvního jedince při použití této metody (4). Využití se zpočátku předpokládalo v případech, kdy partnerův ejakulát obsahoval velmi nízký počet spermií, spermie byly málo pohyblivé, nebo zcela nepohyblivé a nebyly tak schopny penetrovat zónou pellucidou. Využití je také zřejmé i v případech, kdy v ejakulátu žádné spermie nejsou, to je při obstrukční nebo neobstrukční azoospermii (5). Spermie se získávají mikrochirurgickým odběrem z nadvarlete (MESA – microsurgical epididymal sperm aspiration; pokud je aspirace neúspěšná, je nutné přistoupit k TESE – testicular sperm extraction s vyjmutím části tkáně varlete a následné izolaci spermií z ní).

Metoda ICSI je ale široce využívána i v těch případech, kdy počet spermií partnera je dostačující pro normální oplození v suspenzi. Důvodem je to, že po ICSI je v podstatě absolutní jistota, že spermie se skutečně nachází v oocytu. Modifikace ICSI nebudeme dále zmiňovat v detailech (např. IMSI – intracytoplasmic morphologically selected sperm injection).

V kontextu předkládaných tezí je však nezbytné se zmínit o hodnocení embryí (zygot) ve stádiu prvojader a odhadu jejich vývojového potenciálu podle počtu a distribuce jadérek. V podstatě se jedná o první neinvazivní a velmi jednoduchý způsob predikce vývojové schopnosti embrya (6).

Přibližně za 16 – 20h po ICSI nebo oplození v suspenzi jsou zygoty hodnoceny: měly by obsahovat jak samčí tak i samičí prvojádro přibližně stejné velikosti, centrálně umístěné a první a druhé pólóvé tělísko. Embrya s vysokým potenciálem vývoje a implantace by pak měla v obou prvojádrech obsahovat přibližně stejný počet jadérek a i jejich distribuce by měla být přibližně stejná. Význam tohoto hodnocení potvrdila řada prací, je však nezbytné podotknout, že řada prací se s ním neztotožnila (7). Hlavní příčinou je jistě i to, že nebyla



známa biologická podstata, proč by tomu tak mělo být. S nástupem prvního mitotického dělení se jadérový materiál stejně rozpustí v cytoplasmě a následně je přítomen v jádrech dvoubuněčného embrya.

Vysvětlení a podnět k tomu, že by bylo vhodné se hodnocením prvojader zygot znovu systematicky zabývat podává naše práce (8) a práce, kterou publikovali Kyogoku a kol. ve stejném roce (9).

Z obecného hlediska představuje publikace Tesarika a Greca první postup, který naznačuje možnosti a význam neinvazivního hodnocení úspěšnosti vývoje embrya. Dané hodnocení nevyžaduje v podstatě žádné nadstandardní speciální vybavení. Další postupy neinvazivního hodnocení jsou zaměřeny na kontinuální sledování vývoje embrya. Za tímto účelem byla vyvinuta řada zařízení, která umožňují v určitých intervalech pořizovat záběry embrya během jeho kultivace přímo v inkubátoru (noninvasive time-lapse imaging). Jako zásadní se zdají být především fáze dělení před aktivací embryonálního genomu (stádium 4 blastomer – EGA, embryonic genome activation), dále pak fragmentace embrya a sledování osudu jednotlivých fragmentů, kde byla zjištěna poměrně vysoká korelace s aneuploidii. S pomocí speciálního software lze pak vývoj vyhodnotit a vybrat jen ta nejkvalitnější embrya (10). Někteří pracovníci center IVF uvádějí, že zvládnutí neinvazivního hodnocení umožňuje vybrat euploidní embrya a tudíž není nezbytný případný preimplantační genetický screening (PGS).

PGS (preimplantační genetický screening) je dalším postupem, který je intenzivně využíván. U oocytů lidí a tím následně i embryí jsou, oproti jiným druhům, aneuploidie velmi časté. PGS měl zejména v počátcích vyloučit embrya např. s triploidii chromosomu 21 – Downův syndrom. Z embrya se před kompakcí odebrala jedna blastomera, kde se s pomocí FISH detekoval počet kopií daného chromosomu. V současné době je PGS mnohem propracovanější a v podstatě se zjišťuje, zda dané embryo obsahuje kompletní a správnou sadu chromosomů (SNP array). Metoda má řadu modifikací, analýzy lze provádět jak z prvního či druhého pólového tělíska (případně obou), nebo z buněk trofektodermu. Detekovat lze v podstatě vše, což pochopitelně vyvolává řadu etických otázek (11).

Značný rozvoj zaznamenaly i metody dlouhodobého uchovávání embryí při nízkých teplotách. Velmi spolehlivě lze mrazit vyvíjející se embrya (konvenčně i vitrifikací), zájem se ale soustřeďuje i na neoplozené oocyty. Důvody jsou částečně zmíněny výše, řada žen odkládá početí dítěte na pozdější dobu, tím se snižuje kvalita oocytů a zvyšuje se riziko aneuploidii. Uvažuje se tak o aspiraci oocytů z vaječníků v odpovídajícím věku, jejich zamražení a využití v době, kdy se žena rozhodne pro těhotenství. Kryokonzervace oocytů by

ale měla mít především velký význam u onkologických pacientek, kdy příslušná léčba cytostatiky v podstatě zničí značnou část oocytů a k obnovení funkce vaječníků dochází po poměrně dlouhé době, případně k ní nedojde vůbec. Zde se však spíše uvažuje o kryokonzervaci částí vaječníků s jejich zpětnou retransplantací po rozmražení (12).

Význam kryoprezervace oocytů by také mohl mít význam z hlediska etického. Při dobré odpovědi na stimulaci by po aspiraci folikulů mohla být část oocytů použita pro oplození, další část pak zamražena a případně použita později. Mohl by tak odpadnout etický problém, co s nadbytečnými embryi. Špičková pracoviště uvádějí zcela srovnatelné výsledky, pokud jde o vývoj embrya z čerstvých či zmražených oocytů.

Značná pozornost je také věnována metodám zrání oocytů v podmínkách *in vitro*. Oocyty jsou aspirovány z folikulů pacientek jako nezralé (GV – ve stádiu zárodečného váčku) a následně pak kultivovány do stádia metafáze II, kdy jsou oplozeny. Význam by tento postup měl v těch případech, kdy stimulovaný folikul nezaručuje optimální prostředí pro zrání, např. u pacientek se syndromem polycystických ovarií (PCOS), případně pak i v případech, kdy jsou oocyty aspirované z folikulů zjevně opakovaně abnormální. Pracoviště, která se problému zrání oocytů věnují a postupy vyvíjejí, uvádějí v podstatě shodné výsledky embryonálního vývoje jako u oocytů aspirovaných v metafázi II (13). Stejně jako u kryokonzervace je však nezbytné brát dané výsledky s určitou rezervou.

Relativně brzy můžeme očekávat využití metod mikromanipulace při rekonstrukci oocytů (zygot) s cílem eliminace mutované mitochondriální DNA (mtDNA). Mitochondrie embrya pocházejí výhradně od matky (z oocytu) a pokud obsahují mutovanou mtDNA, potomstvo může být těžce poškozeno. Metody detekce mutované mtDNA v pólových těliscích nebo izolované blastomeře nejsou natolik spolehlivé, aby v těchto případech mohla být využita PGD (preimplantační genetická diagnostika). I proto se uvažovalo o tom, že by jaderný materiál z defektního oocytu – metafáze II (případně zygoty – prvojádra), mohl být přenesen do normálního oocytu (zygoty) od dárce, ze kterého by však byl vlastní jaderný materiál vyjmut předem. Postupy mají řadu modifikací a jsou technicky velmi dobře zvládnuté a je jen otázkou času, kdy a kde (GB, USA) dojde k přímé aplikaci (14).

Řada dalších postupů a metod je zatím jen v čistě experimentální fázi, nicméně i tak se o nich uvažuje pro budoucí využití v asistované reprodukci. Diskutována je především přítomnost tzv. „germline stem cells“, kmenových buněk, z nichž by bylo možné získat oocyty i po dosažení menopauzy. Zjevné by také bylo využití u onkologických pacientek. K danému problému byla publikována řada prací s protichůdnými výsledky a na skutečné potvrzení si budeme muset ještě počkat (15).

Zcela věrohodné jsou však výsledky, které publikovala skupina Mitinoru Saita z Japonska. Autorům se podařilo vyprodukovat jak spermie, tak i oocyty z embryonálních kmenových (ESC) a dokonce i z indukovaných pluripotentních buněk (iPSC) u myši. Tyto pohlavní buňky pak byly použity při oplození *in vitro* se vznikem zcela normálního potomstva. Produkce oocytů a spermií u lidí tímto způsobem by byla pochopitelně mnohem složitější, řada pracovišť však o této cestě intenzivně uvažuje (16).

V uvedeném přehledu zmiňujeme stručně jen některé metody, které byly, jsou a pravděpodobně budou zaváděny do asistované humánní reprodukce. Detailní rozbor jednotlivých postupů by mohl mít stejný rozsah, jako celý přehled.

Jaké dopady by mohlo mít využití těchto postupů na potomstvo, to zůstává otázkou (17). Dosud nebyly publikovány výsledky, které by dokazovaly, že se děti počaté s pomocí *in vitro* technik liší od dětí počatých *in vivo*. Je ale otázkou, zda se s problémy nesetkáme v dalších generacích – u potomstva IVF dětí (epigenetic transgenerational inheritance - germline mediated inheritance of epigenetic information between generations that leads to phenotypic variations in the absence of direct environmental influence).

I přes zavádění nových metod je základním předpokladem úspěchu IVF profesionální práce pracovníků IVF klinik a IVF laboratoře, jejich znalosti v dané oblasti a schopnost posouzení kvality biologického materiálu. Permanentní trénink na nevyužitém biologickém materiálu (nezralé a méně kvalitní oocyty) by měl být pak základním předpokladem k tomu, aby příslušná IVF centra mohla zavádět další nové progresivní postupy.

## CÍLE PRÁCE

Práce se zaměřuje na sledování epigenetických a strukturálních změn, které je možné detekovat během zrání oocytů a časného embryonálního vývoje, s cílem extrapolace těchto informací pro humánní asistovanou reprodukci.

Jednotlivé cíle:

1. Vyhodnotit stimulační protokoly, které jsou používány ke kontrolované ovariální hyperstimulaci v centrech asistované reprodukce
2. Charakterizovat kvalitu nepoužitých lidských oocytů (oocyty, které po aspiraci z folikulů nejsou ve stadiu metafáze II), konkrétně jejich epigenetický status (acetylace histonů) v souvislosti s vysokou frekvencí aneuploidií v humánních oocytech
3. Vyhodnotit, zda je možné tyto oocyty využít jako výchozí biologický materiál, ze kterého lze derivovat linie ESC (konverze meiosis na mitosu)
4. Objasnit funkci specifických jadérek (NPBs), která jsou přítomna v oocytech s dokončeným růstem a v embryích během prvních stádií časného vývoje a dále využít tyto poznatky k hodnocení vývojového potenciálu zygot (podle počtu a distribuce NPBs v prvojádrech)

## KOMENTÁŘ A DISKUZE K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM

### **I. An observational study of assisted reproductive technology outcomes in new European Union member states: an overview of protocols used for ovarian stimulation (Studie technologií asistované reprodukce v nových členských státech EU: přehled protokolů ovariální stimulace)**

Vlaisavljević, V., Meden-Vrtovec, H., Lewandowski, P., Radwan, M., Langerova, A., Vicena, M., Války, J., Herman, M., Usoniene, A. & Treijs, G. ; *Curr Med Res Opin.* **26**, 819-825 (2010)

U lidí je ze 100 oocytů vystavených spermii u přirozeného oplození (*in vivo*) oplozeno 84 a jen 69 embryí implantuje. O týden později je však životaschopných pouze 42 embryí. 37 přežije 6 týdnů a do narození jedince se vyvíjí 31 embryí. Je tak zřejmé, že normální proces oplození a implantace u lidí představuje ztrátu kolem 70%. Reprodukce u lidí je tak vysoce neefektivní (1). Tato nízká efektivita má řadu příčin a podle okolností je jí možno řešit i metodami asistované reprodukce.

Nejčastější příčina poruchy plodnosti u žen je oligo- či anovulace. Normální růst folikulu s následnou ovulací vyžaduje bezchybné fungování hypothalamo-hypofyzární-ovariální osy. V nucleus arcuatus v hypothalamu je ve folikulární fázi menstruačního cyklu vylučován v 50-60 minutových pulzech nativní gonadotropin releasing hormon (GnRH), který se portálním řečištěm dostává do adenohipofýzy, kde je v návaznosti na pulzy vylučován folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), jejichž účinek následně zabezpečuje fyziologickou steroidogenezi a folikulogenezi (2).

V klinické praxi se anovulace dle klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) dělí do tří skupin. Skupina I - hypogonadotropní hypogonadismus bývá způsoben poruchou na hypothalamo-hypofyzární úrovni, jinými příčinami může být extrémní fyzické zatížení, stres, nedostatek potravy s nadměrnou ztrátou tělesné hmotnosti. Skupina II - normogonadotropní anovulace bývá velice častým symptomem u žen s polycystickými vaječníky, skupina III - hypergonadotropní hypogonadismus znamená selhání funkce vaječnicků, kdy jedinou terapeutickou možností poruchy plodnosti je léčba pomocí darovaného oocytu (3).

Jednou z nejvíce používaných metod asistované reprodukce je „*In vitro fertilizace a embryo transfer (IVF/ET)*“, principem této metody je oplodnění vajíčka mimo tělo ženy a následné přenesení embrya do děložní dutiny. Léčba pomocí IVF ET je indikována v následujících případech poruchy plodnosti:

- andrologický faktor
- tubární faktor
- endometrióza
- ovariální faktor (anovulace)
- imunologická příčina poruch plodnosti
- genetické příčiny poruch plodnosti s nutností PGD/PGS (Preimplantation Genetic Diagnosis/Screening)

Průběh mimotělního oplodnění lze pak rozdělit do čtyř fází:

- kontrolovaná ovariální hyperstimulace (KOH)
- odběr oocytů (OPU, Ovum Pick Up)
- oplodnění oocytů
- embryotransfer

Jak uvádíme výše, i za normálních okolností je proces oplození u lidí vysoce neefektivní. Pro zvýšení šance úspěchu se proto vaječníky pacientek stimulují k produkci většího počtu oocytů (kontrolovaná ovariální hyperstimulace) a po oplození a následné kultivaci se pro přenos do dělohy vybírají ta nejlepší embrya. Nadbytečná embrya se většinou uchovávají v tekutém dusíku pro případné další použití (4).

Ovariální stimulace v rámci léčby pomocí IVF ET je postup, kde došlo v průběhu několika posledních let k největším změnám a která významně přispěla ke zvýšení efektivity léčby. Za fyziologických podmínek se během menstruačního cyklu začíná vyvíjet více folikulů, ale dozrává většinou jen jeden, ostatní podléhají atrezii. Zvýšení hladiny FSH exogenně podávanými gonadotropiny vede k růstu a zrání celé kohorty folikulů. Multifolikulární odpověď vaječníků tedy zajišťuje stimulace gonadotropiny, kvalita získaných oocytů závisí na úrovni kontroly sekrece LH hypofýzou pomocí agonistů či antagonistů GnRH (5).

K léčbě se stále mohou používat gonadotropiny původem z moči (hMG-lidský menopauzální gonadotropin, uFSH-lidský folikulostimulační hormon močového původu), většina center asistované reprodukce však dává přednost rekombinantním preparátům (rFSH-

rekombinantní folikulostimulační hormon). S vývojem biotechnologií se zvyšovala čistota, specifická aktivita a bezpečnost jednotlivých preparátů (6).

Nyní je již v klinické praxi i depotní rFSH, který pacientkám stimulaci dále usnadňuje. Při výběru typu hormonální stimulace vaječnicků je nutné přistupovat ke každé ženě individuálně. Hlavní faktory, které ovlivňují reaktivitu vaječnicků na stimulaci je věk ženy, BMI (body mass index, bazální hladina FSH (folikulostimulační hormon), AFC (detekce antrálních folikulů, antral follicle count), AMH (anti-müllerian hormone). Především tyto parametry je nutné zohlednit při stanovení stimulační dávky gonadotropinů (7).

Aby se předešlo předčasné ovulaci, aplikují se současně s gonadotropiny analoga GnRH (gonadotropin releasing hormone), agonisté nebo antagonisté GnRH, žádoucím účinkem aplikace analog je útlum funkce hypofýzy omezující vyplavení endogenního LH, který by mohl způsobit předčasnou ovulaci.

#### *Agonisté GnRH*

GnRH je dekapeptid s biologickým poločasem rozpadu několik minut, agonisté GnRH vznikly náhradou aminokyselin nativního GnRH v poloze 6 a 10, čímž se zvýšila vazebná afinita k receptorům gonadotropiny secernujících buněk v adenohipofýze 100-200x a současně se prodloužil biologický poločas rozpadu na několik hodin. Bezprostřední reakce na podání agonisty GnRH je okamžitá syntéza a sekrece FSH a LH a tím zvýšení počtu receptorů, tzv. „flare-up“ efekt. Při dlouhodobém obsazení receptorů však dochází k jejich internalizaci do buňky, která tedy přestává reagovat na GnRH s následným poklesem FSH, LH, Estradiolu. Této desenzitivizace a down regulace je dosaženo za 14-21 dní po zahájení aplikace analog. Tohoto mechanismu se využívá v tzv. dlouhých stimulačních protokolech v souvislosti s mimotělním oplodněním, kdy aplikace gonadotropinů je zahájena až po down regulaci, což spolehlivě zamezí nežádoucí sekreci LH adenohipofýzou, nedojde tedy ke snížení kvality oocytů na podkladě luteinizace in situ a ani nehrozí předčasná ovulace. Naopak „flare-up“ efektu se využívá k potencování účinku gonadotropinů u žen špatně reagujících na stimulaci („low responders“), kdy se současně na počátku menstruačního cyklu aplikují gonadotropiny společně s GnRH agonisty, další kontinuální aplikace agonistů navodí desenzitivizaci a down regulaci adenohipofýzy, která zabrání předčasné ovulaci (8).

#### *Antagonisté GnRH*

Původní molekula GnRH je modifikována v poloze 1,2,3,6 a 10, účinek antagonistů GnRH je založen na kompetitivní blokáde receptorů v buňkách adenohipofýzy, při jejich adekvátní koncentraci, tudíž dochází prakticky okamžitě k blokáde sekrece FSH a LH. Stimulace samotnými gonadotropiny se zahajuje na počátku menstruačního cyklu, a

v okamžiku, kdy začíná hrozit nežádoucí sekrece LH, je hypofýza dočasně blokována antagonistou (9).

V současné době jsou stimulační protokoly s antagonisty zlatým standardem v reprodukční medicíně. Jejich předností je jednoduchost, kratší doba trvání stimulace, nižší spotřeba gonadotropinů, nižší riziko OHSS (ovariální hyperstimulační syndrom). Stimulační protokoly s agonisty i s antagonisty vždy vyžadují luteální suplementaci gestageny. Hlavní příčinou defektní luteální fáze je suprafyziologická produkce steroidů mnohočetnými žlutými tělísky v časně luteální fázi. To vede k útlumu sekrece LH na podkladě negativní zpětné vazby na úrovni hypothalamo-hypofyzární osy, přičemž corpus luteum potřebuje pro svoji normální funkci kontinuální stimulaci pomocí LH (10).

Výše uvedená práce představuje výsledky studie, jejímž cílem bylo monitorovat účinnost a bezpečnost gonadotropinu follitropinu alfa v klinické praxi.

Do studie byly zahrnuty ženy mezi 18-47 lety s diagnózou poruchy plodnosti primární a sekundární. Příčiny poruch plodnosti byly tubární faktor, ovariální faktor (anovulace), endometrióza, mužský faktor, jiné (př. imunologický faktor). Pacientky byly stimulovány dle zvyklostí na příslušné klinice asistované reprodukce. Ke stimulaci byly používány stimulační protokoly s agonisty i s antagonisty.

Celkově bylo hodnoceno 4055 pacientek, které podstoupily cyklus mimotělního oplodnění. V 72,9% byly pacientky mladší než 34 let, 35-38 let bylo 18,5%, žen starších než 38 let bylo 7,6%. Ke kontrolované ovariální hyperstimulaci byl používán follitropin alfa (FbIU-filled by bioassay, FbM-filled by mass). Protokol s agonisty byl používán u 49% pacientek, protokol s antagonisty u 48 % pacientek. K indukci ovulace byl používán u-hCG (močový lidský chorigonadotropin) či r-hCG (rekombinantní lidský choriogonadotropin). K suplementaci luteální fáze byl užíván progesteron vaginálně či intramuskulárně.

Průměrný počet získaných oocytů během jednoho cyklu mimotělního oplodnění konvenčním IVF byl 10,4. Průměrný počet přenášených embryí následně byl 1,9. Průměrný počet získaných oocytů během cyklu mimotělního oplodnění, které byly oplodněny pomocí ICSI bylo 9,6. Následně průměrný počet přenášených embryí byl 2,0.

Celkově otěhotnělo 39,5 % pacientek (1603/4055). Vyšší pregnancy rate (PR) byl u pacientek, které používaly ke KOH follitropin alfa FbM(41,3%), než u pacientek stimulovaných follitropinem alfa FbIU (37,8%,  $p=0,022$ ). Průměrné množství follitropinu alfa spotřebovaného u protokolů s agonisty bylo 2085 IU, u protokolů s antagonisty 1987,0 IU. Nežádoucí účinky KOH: u 6,7 % pacientek se rozvinul ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS), OHSS I-II stupně byl v 5,6%, OHSS II-IV stupně byl v 0,9%.



U 1,1 % došlo k mimoděložnímu těhotenství, 12,5 % gravidit skončilo spontánním potratem, 1,1% gravidit indukovaným potratem, 16,0% bylo vícečetných těhotenství.

Kontrolovaná ovariální hyperstimulace musí být pro pacientku především bezpečná, musí respektovat fyziologické reprodukční procesy (11). Vždy je nutné přistupovat ke každé ženě individuálně a připravit adekvátní stimulační protokol. Rozvoj moderních, individualizovaných, efektivních a bezpečných protokolů („patient-friendly“) je spojen s nástupem a rozšířením rekombinantního rFSH, který se aplikuje pomocí tzv. pera a především s nástupem antagonistů GnRH.

## II. Chromatin acetylation in human oocytes (Acetylace chromatinu v humánních oocytech)

Langerova, A.; *Ginekolo Pol.* 84, 263-267 (2013)

Acetylace je jednou z nejčastěji studovaných histonových modifikací, která přímo souvisí s regulací transkripce. Acetylace lysinových residuí vede k relaxaci struktur chromatinu, což následně umožňuje vazbu transkripčních faktorů a tím aktivaci exprese genů (1). Mezi enzymy regulující acetylaci patří histon acetyltransferázy (HAT) a deacetylázy (HDAC).

Při studiu procesů zrání oocytů savců bylo navíc zjištěno, že procesy acetylace chromatinu (stav acetylace chromosomů) mohou být významným ukazatelem, podle něhož je možné posuzovat průběh a normalitu segregace chromosomů během zrání (2).

Obecně, po značení chromatinu specifickými protilátkami proti acetylovaným histonům (např. H3K9, H3K14, H4K5, H4K12, hyperacetylovaný H4, atd.) bylo zjištěno, že chromatin zárodečného vajíčku (GV) v oocytech s ukončeným růstem myši je ve většině případů acetylován. To je svým způsobem paradoxní, neboť tyto oocyty jsou transkripčně inaktivní. Po rozpadu GV byly však chromosomy bez značení – prometáfáze/metáfáze I. V telofázi I vykazoval chromatin mírně pozitivní značení. To však opět nebylo patrné v metafázi II. Prvojádra embryí byla pozitivně značena. Pokud nedošlo k oplození a oocyty zestárlý v kultuře, došlo k opětné acetylaci chromosomů (3,4).

Tento průběh značení byl však typický pro oocyty mladých samic myši (3 týdny). Pokud byly k pokusu použity oocyty samic o stáří 10 měsíců, přibližně u 50% oocytů nedošlo v průběhu zrání k deacetylaci – chromatin byl acetylován i např. v MI. Navíc byla zjištěna velmi těsná korelace mezi stavem acetylace chromatinu a aneuploidie, např. při inkubaci oocytů v trichostatinu A (TSA/inhibitor HDAC) (5). S určitými mírnými odlišnostmi byl průběh acetylace/deacetylace při zrání oocytů popsán i u dalších druhů (ovce, prase) (6,7).

Z pohledu asistované reprodukce jsou tyto výsledky velmi zajímavé. Např. výskyt Downova syndromu narůstá s věkem ženy (trisomie 21chromosomu). Výskyt trisomie 21 u potomstva je zanedbatelný při věku matky do 30-34 let (0.5%), pak však velmi výrazně narůstá (5% ve 40 letech). Oproti jiným druhům jsou aneuploidie u oocytů lidí mnohem četnější (5 vs. 50% i více). Hodnocení však závisí na metodě a pochopitelně je ovlivněno i nedostatkem materiálu k hodnocení (8). V současné době je navíc i trend odkládat těhotenství na pozdější dobu. Významnou roli by mohla mít i výživa (nadváha). V současné době je na světě více lidí s nadváhou než s podváhou. U myši vede kalorická restrikce k výraznému snížení aneuploidii u oocytů (9).

Pokud bychom tedy extrapolovali výsledky získané u pokusných zvířat na oocyty lidí, mohli bychom u nich předpokládat mnohem vyšší frekvenci pozitivního značení.

V našich pokusech jsme hodnotili acetylaci u nepoužitých oocytů pacientek na IVF klinice GENNET. Pacientky byly stimulovány protokolem s antagonisty GnRH + rFSH a oocyty aspirovány z folikulů za 36 hodin po indukci zrání oocytů (36 hodin po aplikaci 250 µg rhCG, rekombinantního humánního choriového gonadotropinu). Pro IVF (in vitro oplození) jsou na klinice používány pouze ty oocyty, které se nacházejí bezprostředně po aspiraci ve stádiu metafáze II. Oocyty, které nebyly v tomto stádiu, byly použity v našich pokusech. Ve všech případech jsme měli pro dané hodnocení souhlas pacientů. Vybrané oocyty byly po krátkou dobu před fixací inkubovány v termostatu při teplotě 37°C a atmosféře 5% CO<sub>2</sub> ve vzduchu. Během této inkubace dosáhly některé oocyty stádia MII. S ohledem na podmínky na klinice jsme nehodnotili vztah mezi věkem pacientky/značením a diagnózou/značením. K pokusu byly vybrány pouze zjevně nedegenerované oocyty. Pokud jsme nezralé oocyty (GV) kultivovali po 30h v MEM, obvykle 75 až 80% z nich došlo do MII. I to nasvědčuje tomu, že pro naše hodnocení byl použit relativně kvalitní materiál.

Oocyty byly následně fixovány v paraformaldehydu a dále pak značeny protilátkami proti acH4/K12 a hyperacetylovanému H4. Obě tyto protilátky byly otestovány již dříve na myších v laboratoři VÚŽV (10). Abychom vyloučili případné chyby, v pokusech jsme v některých případech inkubovali s protilátkami v jedné jamce i oocyty myši a skotu v různých stádiích zrání. Oocyty skotu byly získány aspirací folikulů zvířat porážených na jatkách a následně kultivovány do požadovaného stádia (0h – GV, 10h – MI, 20h – MII); oocyty myši pocházely z folikulů PMSG stimulovaných samic (GV), MI oocyty byly fixovány po 8h kultivace, MII – byly většinou ovulované oocyty. Oocyty lidí, myši a skotu lze od sebe snadno rozlišit podle velikosti a vzhledu. Omezený počet humánních oocytů nám nedovolil použít více protilátek.

Naše výsledky pak dokázaly, že většina oocytů stádia GV (u všech tří druhů) byla pozitivně značena vybranými protilátkami. Výjimečně byly fixovány i humánní oocyty ve stádiu telofáze I. I ty vykazovaly zjevně pozitivní signál značení. V tom se naše výsledky shodují s výsledky získanými jinými autory u myši. Překvapivé však bylo, že přibližně polovina humánních oocytů v metafázi I a II vykazovala pozitivní značení chromosomů. To je oproti jiným druhům výrazně vyšší podíl. V našich pokusech byly oocyty myši i skotu pozitivně značeny v daných stádiích jen výjimečně. V době dokončení našich pokusů nebyla publikována obdobná práce, v průběhu přípravy rukopisu článku však publikovala obdobné výsledky holandská skupina. I v jejich článku byla přibližně polovina oocytů v metafázi

pozitivně značena. Vyšší frekvence pozitivního značení však byla navíc i zjištěna u starších pacientek (11).

Z obecného hlediska tyto výsledky dokazují relativně nízkou kvalitu oocytů lidí. Mnohem vyšší frekvence pozitivního značení v metafázích může vysvětlovat i mnohem vyšší výskyt aneuploidií v humánních oocytech. Před konečným závěrem je však třeba mít na zřeteli následující:

i/ pro pokusy nebyly použity ty nejlepší oocyty, ty byly použity pro IVF.

ii/ oocyty pocházely od pacientů s různými formami neplodnosti, je tak možné, že určité poruchy folikulogeneze mohou ovlivnit prostředí, ve kterém oocyt zraje a tím i procesy acetylace/deacetylace (PCOS, polycystic ovarian syndrome). Nejsme si vědomi toho, že by k tomuto problému byla publikována nějaká studie (příčina neplodnosti/acetylace/deacetylace).

iii/ oocyty pocházely od stimulovaných pacientek (to by však teoreticky nemělo mít zásadní vliv). Je však známo, že oocyty myši od superovulovaných samic mají nižší kvalitu a jsou méně vhodné pro přenosy jader oproti oocytům z přirozených ovulací.

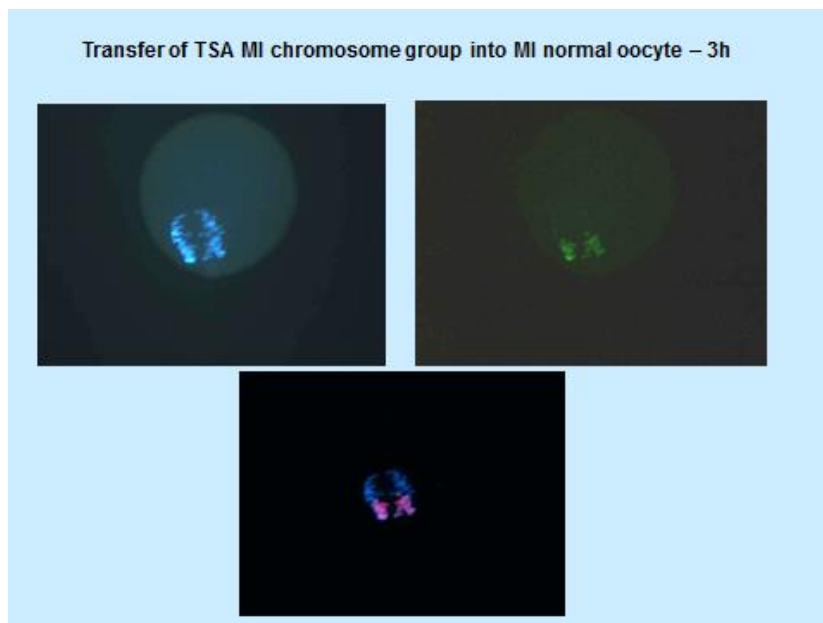
iv/ běžná činnost na klinice může mít vliv na kvalitu zpracování biologického materiálu. Je zcela logické, že preciznost zpracování biologického materiálu bude vyšší v biologické laboratoři oproti IVF pracovišti.

I s ohledem na obecné argumenty pod body i až iv/ se domníváme, že kvalita oocytů, které nedosáhly v době aspirace z folikulů stádia metafáze II je oproti oocytům již dozrálým nesrovnatelně nižší a tyto oocyty by neměly být používány pro IVF ani v případech, že následně dozrají. Proč tomu tak je, je velmi obtížné usoudit. Tento závěr má však i podporu v nedávné práci S. Mitalipova, jehož skupina vytvořila klonovaná lidská embrya a následně derivovala velmi úspěšně linie ESC z těchto embryí (12). Autoři uvádějí, že základním předpokladem jejich úspěchu bylo použití superkvalitních oocytů. Tím lze také vysvětlit negativní výsledky předchozích prací, kde pro přenosy jader byly použity oocyty, které se nenacházely při aspiraci v metafázi II (13,14).

Tento závěr by ostatně mohla potvrdovat i naše další práce, ve které jsme se snažili o ustavení linií ESC ze zrajících oocytů.

Naše studie by mohla přinést doporučení i pro řešení neplodnosti u pacientek s abnormální funkcí vaječníku (PCOS, atd.). V těchto případech bude spíše lepší izolovat oocyty z folikulů ve stádiu zárodečného váčku a nechat je dozrát do metafáze II v podmínkách *in vitro*. Některé studie uvádí, že oocyty dozralé *in vitro* mají relativně stejnou kvalitu ve srovnání s oocytami *in vivo* dozralými. To je však obecný poznatek a pro specifické případy nebyly publikovány detailní informace.

Řešením by také mohl být přenos jaderného materiálu z „abnormálních“ oocytů do oocytů normálních, kde by mohl být acetylovaný chromatin deacetylován (15). Zda by k tomu však skutečně došlo, to zůstává otázkou. Předběžně jsme přenášeli acetylované chromosomy metafáze I myši (po inkubaci oocytů v TSA, pozitivní acetylaci) do oocytů, které nebyly v TSA inkubovány. Za 3 hodiny po přenosu jsme detekovali v cytoplasmě rekonstruovaných oocytů jednu společnou metafázi I (anafázi I), která však obsahovala jak acetylované, tak i neacetylované chromosomy.



### III. Pluripotent stem cells from maturing oocytes (Pluripotentní kmenové buňky ze zrajících oocytů).

Langerova, A., Fulka, H. & Fulka, Jr., J.; *Cell Reprogramm.* 15, 389-393(2013)

I přes nástup technologií derivace indukovaných pluripotentních buněk (iPSC), případně STAP buněk (stimulus - triggered acquisition of pluripotency) – zůstávají embryonální kmenové buňky (ESC) jakýmsi „zlatým standardem“, podle něhož jsou posuzovány parametry ostatních typů pluripotentních (totipotentních STAP) buněk (1,2,3).

ESC byly poprvé derivovány u myši, následně pak u lidí, krys, králíka a primátů. ESC se nepodařilo dosud derivovat u hospodářských zvířat. ESC se zpravidla derivují z embryí ve stádiu blastocyst a musí splňovat následující parametry: po indukci diferenciaci musí tvořit buňky všech tří zárodečných listů, případně po přenosu do blastocysty a narození chimér by z nich měly vznikat i pohlavní buňky. Z ESC nevznikají buňky placenty, k tomu dochází pouze u STAP buněk. Zde jsou však informace poměrně nové a potřebují další ověření. U myši lze získat ESC i z parthenogenetických, andro- a gynogenetických embryí. U lidí z embryí normálních a parthenogenetických (4,5,6).

U lidí však je navíc jeden zásadní problém, tj. že použitím embrya se toto embryo v podstatě zničí a tím zanikne potenciálně i nový život. Proto má derivace humánních ESC mnoho odpůrců a tím se upřednostňují iPSC postupy. Možnosti jsou pak dány i legislativou dané země (7).

Derivace humánních linií ESC je však i tak stále atraktivní. O tom svědčí i dvě nedávné práce publikované v Cell a PNAS (8,9).

V roce 1999 Fulka, Jr. et al. zjistili (10), že pokud jsou oocyty myši ve stádiu pozdní metafáze I (MI) přeneseny do média s inhibítorem Cdk1 kináz (Butyrolactone 1, BL 1), následuje vydělení pólového tělíska, chromosomy ale neutvoří metafázi II. Místo toho je v cytoplasmě patrné pseudo-prvojádru, které obsahuje prominentní jadérko. Překvapující ale bylo, že po odmytí BL 1 se oocyty přímo rozdělily na dvoubuněčné embryo. Morfologické hodnocení metafázní skupiny před rozdělením ukázalo, že obsahuje mitotické chromosomy. To znamená, že po vydělení pólového tělíska, dekonenzaci chromosomů MI a tvorbě pseudo-prvojádru, došlo v něm k replikaci DNA (BrdU). Pozitivní na replikaci byla i jádra v pólových těliscích, což znamená, že se vlastně přímo vyloučila druhá pólová tělíska. Oproti prvním pólovým tělískům, která nejsou stabilní a brzy se rozpadnou, tato pólová tělíska byla značně stabilní. Vzhledem k tomu, že pokus byl směřován jiným způsobem (checkpoints), autoři dále nesledovali vývoj BL 1 embryí.

K tomu se vrátili až o řadu let později (11). Oocyty myši BDF 1 byly kultivovány do metafáze I (~ 7h) a následně přeneseny do média s BL 1 (100 µg). Během 1-2h došlo k vydělení pólových tělísek a za 6h byla patrna pseudo-prvojádra. Pokud byly oocyty velmi pečlivě selektovány po izolaci z vaječníku a vybrány jen ty nejlepší (odpovídající velikosti a kompletně obklopené kumulárními buňkami), došlo k vydělení pólového tělíska a tvorbě pseudo-prvojádra v podstatě ve všech případech. Podstatný vliv má i inkubační médium, nejlepší odpověď byla v KSOM (Millipore).

Po odmytí BL 1 asi za 16h byly oocyty s pseudo-prvojádry kultivovány v čistém KSOM, kde se během 6 - 8h se zpravidla rozdělily na dvoubuněčná embrya a 20 až 30 % z počátečního počtu oocytů s pseudo-prvojádry dosáhlo stádium blastocysty vysoké kvality (ICM, inner cell mass pozitivní na Oct 4, trofektoderm na Cdx 2). Tyto blastocysty nebyly odlišné od normálních blastocyst. V některých následných pokusech jsme získali až 60 % blastocyst (AL nepublikované výsledky). Tato embrya byla diploidní.

Z těchto embryí byla následně ustavena řada linií ESC. U nich byla potvrzena absence paternálního genomu, potvrzena diferenciacie na buňky všech tří zárodečných lišt, tvorba teratomů a participace na tvorbě tkání v chimérických myších. Nepodařilo se ale získat potomstvo, které by pocházelo BL ESC buněk. Předpokládáme ale však, že to bylo dáno určitými omezeními související s prováděním daného pokusu.

Zajímavé bylo, že obdobným způsobem se podařilo získat i blastocysty skotu vysoké kvality. Jak je však uvedeno výše, u hospodářských zvířat nebyly dosud ustaveny linie ESC, proto nebylo možné otestovat tyto blastocysty stejně, tak jak tomu bylo u myší.

U lidí však metody ustavení ESC existují, jsou velmi dobře popsány a z tohoto důvodu jsme se v našich pokusech zaměřili na možnost využití nadbytečných oocytů k tomuto účelu. V předchozí práci uvádíme, že po stimulaci pacientek jsou z folikulů aspirovány i oocyty, které se nenacházejí ve stádiu metafáze II a nejsou tak dále používány. Obecně se jejich počet pohybuje kolem 10%. V závislosti na stádiu zrání jsme pak tyto oocyty buď kultivovali *in vitro* (GV, nezralé oocyty), nebo po transportu z IVF kliniky do VÚŽV přímo přenesli do média s BL 1 (oocyty bez patrného GV, pravděpodobně v MI). Metodika těchto pokusů byla stejná jako u myší (11), proto nebude detailně uváděna. Oocyty byly v médiu s BL 1 (KSOM, BL 100 µg) kultivovány přes noc (~ 15-16h) a následně hodnoceny. Ze 137 oocytů 101 (74%) vydělilo pólové tělíska a v cytoplasmě bylo pozorováno dobře viditelné pseudo-prvojádro, které obsahovalo několik jadérek (viz. Fig. 1 příslušné publikace). Inkubace s BrdU pak dokázala (viz. Fig. 2), že v pseudo-prvojádrech dochází k replikaci DNA (27/31). Pozitivně bylo značeno i pólové tělíska.

Po odmytí BL 1 a následné kultivaci v médiích, která jsou používána pro kultivaci embryí v centrech asistované reprodukce – ART 1526 (cleavage medium), ART 1529 (blastocyst medium), CooperSurgical (Sage), USA, bylo však dělení BL embryí spíše výjimečné. Nicméně v některých případech vykazovala dělicí se embrya relativně dobrou kvalitu (viz. obr. 1,2,3). Ve většině případů se však vývoj zastavil ve stádiu 4 buněk (viz. obr. 4). Pouze ve dvou případech jsme získali blastocystu, jejíž kvalita byla spíše diskutabilní.

I když lze brát tyto výsledky jako předběžné, není důvod se nedomnívat, že pokud získáme BL blastocysty, bude z nich možné i ustavit linie ESC.

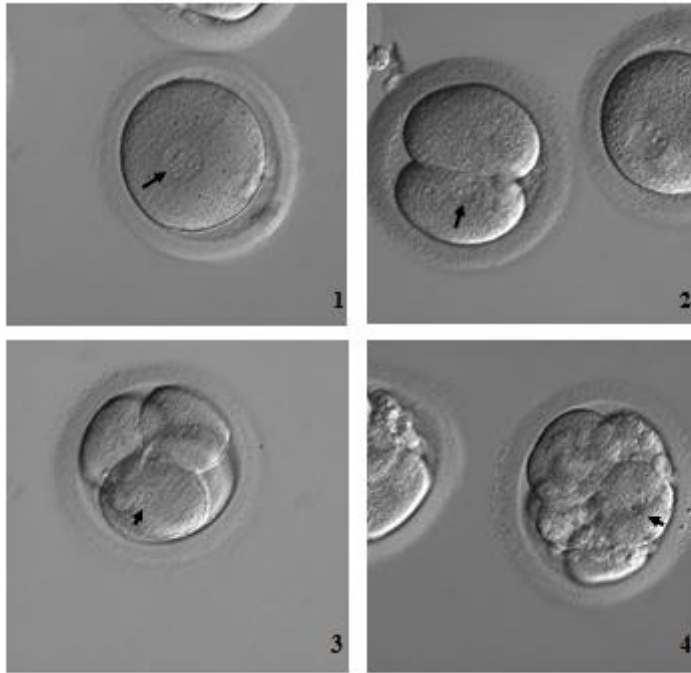
K tomu, aby se daného cíle podařilo dosáhnout je podle našeho soudu základním předpokladem použití vysoce kvalitních oocytů. V předchozí práci (II) jsme dokázali, že populace oocytů aspirovaných z folikulů v jiných stádiích než MII, je velmi nehomogenní a má velmi nízkou kvalitu a pravděpodobně i minimální vývojovou schopnost. To potvrzují i výsledky jiných autorů (12, 13) a především pak práce skupiny S. Mitalipovova při klonování lidských embryí (8).

Při převozu oocytů bez prvního pólového tělíska (1PB) do laboratoře ve VÚŽV však některé oocyty první tělíska vydělili i za suboptimálních podmínek během transportu. Předpokládáme, že tyto oocyty by mohly mít vyšší kvalitu a tím i vyšší vývojovou schopnost oproti zbytku oocytů, které bylo nezbytné dále kultivovat. Optimální by tak bylo přenést oocyty bez GV a 1PB do média s BL 1 přímo na IVF klinice. Zde jsou však omezení, která jsou dána předpisy SÚKL a tak by bylo nezbytné najít odpovídající řešení.

Další možností by bylo využití části populace oocytů, které jsou kultivovány *in vitro* (pochopitelně se souhlasem pacienta nebo dárkyně). Průběh zrání je možné sledovat např. pomocí speciálních mikroskopických systémů (OCTAX polarAIDE) a tak pro inkubaci v BL 1 vybrat pouze ty oocyty, které vykazují metafáze I odpovídající kvality. Zda mají *in vitro* kultivované oocyty stejnou kvalitu jako oocyty dozrálé ve folikulech je otázkou. Řada publikací z posledních několika let však udává, že by tomu tak mohlo být. Další výhodou by v tomto případě bylo, že kultivované oocyty nejsou zbaveny kumulu. I to by mělo pozitivně ovlivnit kvalitu oocytů (14).

Otázkou také je, zda by se nepodařilo získat linie ESC i z BL embryí, která nemají odpovídající kvalitu, nebo jen z blastomer odpovídající kvality. Byly publikovány práce, které tuto možnost zcela nevylučují (15,16,17).





Obr. 1. Humánní oocyt po inkubaci v BL 1. Šipka označuje pseudo-prvojádro. Pólové tělíčko je mimo ohnisko.

Obr. 2. Dvoubuněčné BL 1 embryo. Obě blastomery jsou relativně pravidelné a obsahují jádro (šipka).

Obr. 3. Čtyřbuněčné BL 1 embryo s pravidelnými blastomerami, které obsahovaly jádra (šipka).

Obr. 4. U většiny BL 1 embryí se však vývoj zastavil a došlo k fragmentaci blastomer (šipka označuje jádro v jedné z blastomer).

**IV. Production of giant mouse oocyte nucleoli and assessment of their protein content (Produkce gigantických jadérek izolovaných z oocytů myši a stanovení jejich obsahu proteinů)**

Fulka, H., Martinkova, S., Kyogoku, H., Langerova, A. & Fulka, Jr., J.; *J. Reprod. Dev.* 58, 371-376 (2012)

**The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition (Klíčová role jadérek oocytů při regulaci funkce satelitů centromer v průběhu přechodu ze stádia oocytu na embryo)**

Fulka, H. & Langerova, A.; *Development* 141, 1694-1704 (2014)

-----  
**Transplantation of nucleoli into human zygotes: not as simple as expected? (Přenosy jadérek do humánních zygot: Bude to tak jednoduché, jak se předpokládalo?)**

Fulka, J. Jr., Langerova, A., Loi, P., Martinkova, S. & Fulka, H.; *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 385-399 (2011)

**Nucleolar transplantation and human embryogenesis. Chapter 15. (Transplantace jadérek a embryogenese u lidí)**

Fulka, H., Langerova, A., Martinkova, S. & Fulka, Jr., J. *In: Proteins of the nucleolus: Regulation, translocation and biomedical function. Eds. O'Day, D.H & Catalano, A.; Springer Science and Business Media Dordrecht, pp. 343-357 (2013)*

**How to repair the oocyte and zygote? (Jak opravit oocyt a zygotu?)**

Fulka, H., Langerova, A., Barnetova, I., Novakova, Z., Mosko, T. & Fulka, Jr., J.; *J. Reprod. Dev.* 55, 583-587 (2009)]

V předchozích částech (II a III) poukazujeme na to, že jedním z hlavních omezení výzkumu na humánních oocytech a embryích je především nedostatek kvalitního materiálu. Je to svým způsobem zcela logické, neboť hlavním záměrem asistované reprodukce je léčení neplodnosti – produkce zdravého jedince. Dalším omezením je legislativa dané země a

příslušné předpisy a zákony, které definují, co v dané laboratoři může být (v ČR např. SÚKL).

Pro určení normality humánního embrya se tak používají postupy, které nevedou k jeho zničení, např. vyjmutí pólových tělísek, jedné blastomery, několika buněk trofektodermu (1). V závislosti na možnostech daného centra je pak možné pomocí těchto postupů zjistit, zda je embryo normální.

Tyto postupy můžeme označit jako invazivní, neboť se z embrya vyjme jedna či více buněk. Běžně se používají i neinvazivní metody, při kterých se sleduje rychlost a pravidelnost dělení embrya a jeho morfologie. Po vyhodnocení se vyberou k přenosu ta embrya, která splňují určitá kritéria (2).

Pro daná hodnocení byla vyvinuta řada zařízení jako např. Embryoscope. Využití výše uvedených postupů záleží především na velikosti a finančních možnostech IVF center. V začínajících a menších centrech se oocyty, zygoty a pokročilejší embrya posuzují pouze vizuálně pod stereomikroskopem (mikroskopem).

V roce 1999 publikovali Tesarik a Greco (3) práci, ve které posuzovali vývojovou schopnost zygot podle počtu, rozmístění a velikosti jadérek v prvojádrech. Následně pak rozdělili zygoty do několika skupin, z nichž u první, s rovnoměrným počtem, stejnou velikostí a rovnoměrnou distribucí jadérek popsali nejlepší vývoj do stádia blastocysty. U dalších skupin (nestejný počet jadérek, nerovnoměrná distribuce, nestejná velikost) se embrya buď vůbec nevyvíjela, nebo byl jejich vývoj spíše výjimečný. Toto hodnocení potvrdila řada dalších prací, je však nezbytné podotknout, že byla publikována také řada prací, které se s daným hodnocením neztotožnila (4,5,6). Proč by mohla jádérka představovat vhodné kritérium, nebylo do nedávné doby známo.

V našich pokusech jsme se snažili o vysvětlení, proč by tomu tak mohlo být. Jadérka oocytů s dokončeným růstem (FG – fully grown), v zygotách a velmi časných vývojových stádiích embrya jsou morfologicky specifická a liší se od plně diferencovaných jadérek, neboť obsahují jen densně fibrilární materiál, jehož složení není známo. Diferencovaná jádérka obsahují tři složky – fibrilární centra, granulární a densně fibrilární komponenty. Diferencovaná jádérka obsahují několik tisíc proteinů (z nichž asi 700 bylo definováno) a navíc participují na řadě základních buněčných procesů – transkripce rRNAs, procesingu pre-rRNA, formování ribosomálních subjednotek, kontrola buněčného cyklu, diferenciaci, aktivita genů, atd. (7). Funkce jadérek oocytů a velmi časných embryí zůstávala však dlouho ne zcela jasná. Předpokládalo se však, že slouží jako úložiště materiálu, z něhož se v průběhu vývoje embrya vytváří postupně plně funkční, diferencovaná jádérka.

V rostoucích oocytech se totiž v zárodečných váčcích (GV) nacházejí jádérka, která nejsou morfologicky odlišná od diferencovaných jadérek. S růstem oocytů se však jejich morfologie postupně mění na čistě densně fibrilární strukturu. Ta je patrna i v zygotách v prvojádrech (PN) a v jádrech časných stádií vývoje embrya (v závislosti na druhu a aktivaci embryonálního genomu). Nicméně tato struktura se postupně mění až na jádérka, která jsou zcela diferencovaná (8). Předpokládalo se tak, že se postupně mění původní jadérkový materiál zygot a i z tohoto důvodu se jádérka oocytů a zygot nazývala jako „prekurzory jadérek – nucleolus precursor body (NPB)“. U oocytů s dokončeným růstem a v zygotách jsou NPBs těsně obklopena heterochromatinem. Pokud NPBs nejsou obklopena chromatinem, oocyty dozrají do metafáze II, po oplození dojde k tvorbě prvojader, embryo se však rozdělí pouze do stádia dvou buněk (9 - myš).

Zásadní význam pro objasnění funkce jadérek (NPBs) mělo zjištění, že jádérka lze mikromanipulací vyjmout z FG oocytů, aniž by byly tyto oocyty poškozeny – enukleolace (10). Enukleolaci lze provádět u oocytů těch druhů, kde jsou jádérka viditelná pod mikroskopem (myš, prase, člověk). Enukleolované oocyty mají stejnou schopnost zrání jako oocyty kontrolní, tzn., že dosáhnou stádia metafáze II s normálním karyotypem. Po partenogenetické aktivaci nebo oplození dojde k tvorbě prvojader, která ale jádérka neobsahují (11). Tato embrya se dělí zpravidla pouze do stádia dvou buněk (myš). Zpětná transplantace jadérek (NPB) do enukleolovaných oocytů vede k znovuoobnovení funkce se vyvíjet (12). Pokud jsou ale jádérka transplantována do zygot, které pocházejí z enukleolovaných oocytů, nedojde k obnově funkce vývoje (13). Jadérkový materiál oocytu nesubstituuje jádérka diferencovaných nebo embryonálních kmenových buněk. Přenos jader somatických buněk (nebo ESC – embryonálních buněk) do cytoplasm, které pocházely z enukleolovaných oocytů v MII vedl k tvorbě pseudo-prvojader bez NPBs. Vývoj embryí se však zastavil ve stádiu dvou – čtyř buněk (prase, myš).

Pokud shrneme údaje z výše uvedeného odstavce, znamená to, že jadérkový (NPB) materiál je v oocytech obsažen v definovaném množství a nemůže být znovu nasyntetizován. Jádérka (NPBs) se nepodílí na kontrole buněčného cyklu zrání oocytů (přechod z metafáze do anafáze) a NPB materiál nelze substituovat materiálem diferencovaných jadérek. Enukleolovat lze i časný zygot, pouze však v tom případě, že prvojádra obsahují jen po jednom jádérku. Jádérka lze vyjmout i z humánních oocytů. U zygot (humánní) není enukleolace zatím možná – prvojádra obsahují zpravidla několik jadérek.

V první části našich pokusů jsme se zaměřili na definování obsahu proteinů v NPBs (JRD). Jádérka somatických buněk je snadné získat v dostatečném množství, což usnadňuje

jejich proteomickou analýzu. U oocytů je to velmi obtížné. Při enukleolacích jsme zjistili, že chromosomální materiál zůstává v oocytu, to znamená, že při enukleolacích izolujeme čistý NPB materiál. Navíc jsme pozorovali, že pokud dáme dvě (nebo více) izolovaných jadérek do těsného kontaktu, dojde k jejich rychlé fúzi. To nám umožnilo získat NPBs dostatečné velikosti – dobře viditelná, což usnadnilo další manipulaci s nimi (přenos do vhodných zkumavek, zamražení).

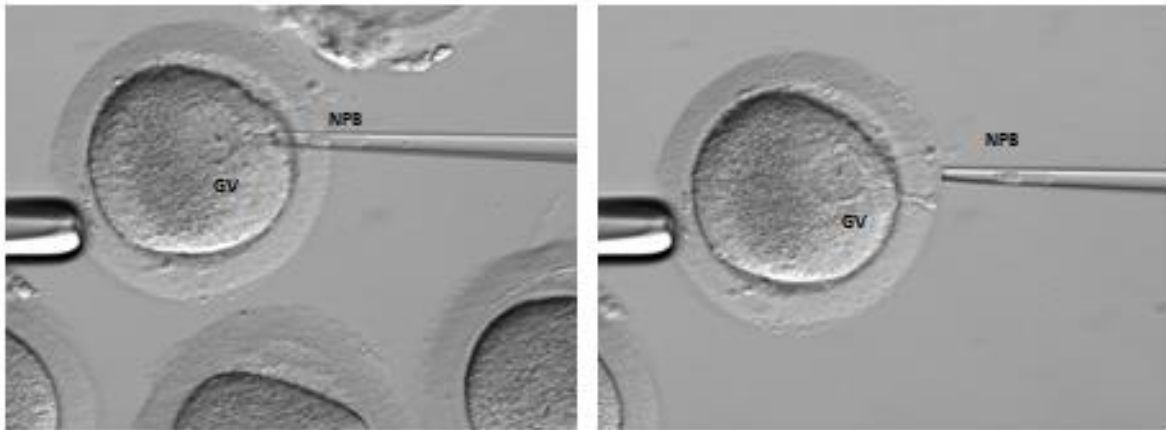
Obsah proteinů jsme pak stanovovali metodou barvení koloidním zlatem s výsledkem 1.6 ng/NPB. Vzhledem k tomu, že se proteomikou nezabýváme, nemůžeme posoudit, kolik jadérek by bylo nezbytné nasbírat pro odpovídající studie. Počet však není teoreticky omezen, omezení jsou dána pouze pracností mikromanipulace.

V druhé části pokusů (Development) bylo naším cílem objasnit, proč dojde k zastavení vývoje embryí, která pocházejí z enukleolovaných oocytů. Jak jsme již uvedli výše, obecné dogma vývojové biologie předpokládalo, že materiál NPBs zygot je postupně transformován na plně funkční jadérka. Jejich transformace pak úzce souvisí se syntézou rRNA, což např. u myši lze detekovat v jádrech blastomer po inkubaci s BrUTP. Žádné rozdíly mezi kontrolami a experimentální (enukleolace) skupinou jsme ale zde nezjistili, a to ani pomocí dalších metod (real-time PCR). Jadérko tak nepředstavuje buněčnou strukturu, která se podílí na aktivaci transkripce (RNA polymeráza I). Stejně tak jsme zjistili, že embryo v podstatě nevyužívá žádný ze zásadních nukleolárních proteinů oocyty/zygoty (B23, C23, fibrilarin, UBF). Naopak, s oplozením v podstatě dochází k jejich kompletní degradaci. Řada dalších analýz kontrolních (NPB+) a experimentálních (NPB-) zygot a jednobuněčných embryí neukázala zásadní rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Další detailní analýzy ale ukázaly, že přítomnost NPB má zásadní vliv na regulaci centrických a pericentrických sekvencí DNA a ovlivňuje výrazně průběh buněčného cyklu – dělení z jedno- do dvoubuněčného stádia a remodelaci chromatinu zejména paternálního genomu.

Hodnotíme-li naše výsledky z klinického hlediska, a to s ohledem na postup hodnocení zygot, který uveřejnili Tesarik a Greco (3), tak naše výsledky podporují závěry jejich práce. Funkce jadérek zygot má zásadní vliv na další vývojovou schopnost embrya. Je obtížné vysvětlit, proč některé práce jejich tvrzení nepodporují. Re-injekce jadérek do zygot myši (~ 6-7h po ICSI) bez jadérek nevede ke znovuuštění jejich vývojové schopnosti (13). To znamená, že jadérka mají významnou úlohu velmi brzy po oplození. Injekce jadérek do cytoplasmy buněk s jádrem (oocytů-GV, zygot-PNs) vede k jejich rychlému transportu do těchto jader. Uvažovali jsme tak, že tímto způsobem by mohly být vývojově zachráněny ty

zygoty, které vykazují zjevné abnormality v distribuci a počtu jadérek v prvojádrech (14,15). Naše práce a další publikace však dokazují, že ačkoliv je navrhovaný postup technicky snadný, předpoklad pozitivního výsledku je silně diskutabilní. Z obecného hlediska by však jistě stálo za to, zabývat se dále neinvazivním postupem hodnocení humánních zygot v širších detailech (např. konvenční oplození vs. ICSI). Je nezbytné také uvést, že dané hodnocení bylo provedeno pouze u lidí. Nejsme si vědomi toho, že podobné analýzy byly provedeny např. u myší.

Z hlediska vývojové biologie pak mění naše výsledky jedno ze zásadních dogmat embryologie, podle kterého se předpokládalo, že materiál NPBs zygot je využíván embryem při dalších děleních a postupně transformován (alespoň částečně) na plně diferencovaná jadérka. Tyto výsledky potvrzuje i další práce, která probíhala v podstatě paralelně s našimi pokusy (Kyogoku a kol.).



Enukleolace humánních oocytů ve stádiu zárodečného váčku. Při aspiraci folikulů jsou někdy získány i oocyty nezralé. V daném případě se jedná o oocyty nízké kvality. I tyto oocyty lze však úspěšně enukleolovat. GV – zárodečný váček, NPB – jadérko.

## ZÁVĚR

V České republice je poměrně velký počet center asistované reprodukce (nebo pracovišť zaměřených na léčbu neplodnosti) s vysokou odbornou kvalitou. Pokud ale hodnotíme jejich publikační aktivitu v zahraničních impaktovaných časopisech (Human Reproduction, Fertility and Sterility, Molecular Human Reproduction, atd.), tak je spíše sporadická a to znamená, že se tato centra v podstatě nevěnují vědecké činnosti a tím se i ztrácí řada údajů a biologického materiálu, které by mohly být využity ke zkvalitnění péče o pacienty a získání nových poznatků, které by mohly vést k dalšímu pokroku v této oblasti.

Proč tomu tak je, je obtížné zodpovědět a jistě má na tom podíl řada faktorů. Hlavní příčina je jistě v samotných centrech a jejich ochotě vytvořit pro vědeckou činnost podmínky. Dalším důležitým faktorem je nedokonalá legislativa, kdy je velmi často obtížné pochopit, co je dovoleno a co ne.

Klíčovými právními předpisy v ČR jsou: zákon č. 373/2011 Sb., zákon č. 227/2006 Sb., ale i zákon č. 40/2009 Sb. (§167). V pohledu na určitý problém si však tyto zákony zásadně odporují.

Pokud bychom tedy například chtěli analyzovat genom lidské spermie mezidruhovým oplozením, což je postup, jehož výsledky byly mnohokrát publikovány, podle zákonů ČR je těžko usoudit, zda se nedopouštíme nezákonné činnosti.

Např. podle §167 (40/2009 Sb.) není možné přenést lidský genom do buněk jiného živočišného druhu a naopak. To ale vypadlo ze zákona 227/2006 Sb., pro svou nelogičnost. A aby to bylo ještě komplikovanější, zákon 373/2011 Sb. říká, že není dovoleno přenést celý genom. Otázkou tedy je, co vlastně platí? Situaci navíc komplikují i permanentní novelizace.

Výklad některých pasáží zákona je velmi obtížný, např.: §167 (2) Stejně bude potrestán (odnětí svobody na tři až osm let a propadnutím majetku) ten,

a) kdo provádí zákroky směřující k vytvoření lidského embrya pro jiný účel než pro přenesení do ženského organismu (*to v podstatě povoluje reprodukční klonování, ne však terapeutické*)

c) kdo během výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách (ESC) provádí s těmito buňkami manipulace směřující k vytvoření nového lidského jedince (reprodukční klonování), (*nedává smysl - pokud se nezaměřuji na ESC, mohu klonovat?*)

Navíc podle zákona 227/2006 Sb. se zdá, že nadbytečné embryo mohou darovat pouze pro ustavení linií ESC (pracovišti s odpovídajícím povolením), nebo ho zlikvidovat. Nemohou ho ale např. zničit fixací a dále analyzovat (popřípadě použít k jiným molekulárně-biologickým postupům).

Je možné uvést řadu dalších příkladů. Proto je i pochopitelné, že centra asistované reprodukce se raději vyhýbají případným problémům, které by mohly nastat, pokud by byl nadbytečný biologický materiál využit pro výzkum.

Další podstatné omezení je v předpisech SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv), který jasně definuje, co je možné v laboratoři IVF použít a co je striktně zakázáno. Tak např. není možné nadbytečné oocyty v laboratoři fixovat v paraformaldehydu, nebo kultivovat v butyrolactone 1. Je nezbytné je odnést do jiné laboratoře, případně převézt na příslušné spolupracující pracoviště výzkumného ústavu. To je časově náročné a ne vždy efektivní, neboť není možné odhadnout, zda nějaký nadbytečný materiál bude vůbec k dispozici.

Poněkud jiná situace nastane, pokud bychom chtěli analyzovat pohlavní buňky (oocyty, spermie). Zde v podstatě žádná omezení neplatí, je však nezbytné si uvědomit, že primárním cílem center je vytvoření kvalitního embrya, což především vede k omezení ve využití oocytů pro případné další analýzy. K dispozici jsou tak oocyty, které se po aspiraci z folikulů nenacházely ve stádiu metafáze II.

Oproti mým původním předpokladům, výše uvedené faktory značně ovlivnily zaměření mé práce a tím bylo nezbytné přistoupit k řadě modelových pokusů na laboratorních zvířatech. Výsledky jsem se však snažila interpretovat tak, abych mohla vysvětlit některé problémy asistované humánní reprodukce a navíc i zjistit, zda je možné využít biologický materiál (oocyty), které běžně nejsou využívány pro oplození in vitro.

Naše výsledky jasně dokázaly, že kvalita oocytů, které se nenacházejí v době aspirace ve stádiu metafáze II, je velmi nízká. Nemá tak smysl nechat je dále kultivovat a čekat až tohoto stádia dosáhnou a pak je použít pro oplození. To by mělo význam pouze v těch případech, pokud všechny oocyty od dané pacienty nedosáhly ještě úplné zralosti. Nejsme si však vědomi toho, že by vývojová schopnost těchto oocytů byla hodnocena v nějaké práci.

V našich pokusech jsme se i pokoušeli o využití těchto oocytů pro ustavení linií ESC tak, jak se to podařilo s oocyty myši (konverzí meiotického dělení na mitotické butyrolactonem 1; BL 1). Pro danou práci není třeba příslušná licence. I když jsou naše výsledky pouze předběžné, je zřejmé, že humánní oocyty odpoví na BL 1 stejně jako oocyty myši - vydělí pólové tělísko a v cytoplazmě je patrné pseudo-prvojádro, které replikuje DNA. Embrya se dále i dělí, blastocystu jsme však získali pouze ve dvou případech. Problému se budeme dále věnovat, neboť se zdá se, že určitou šanci pro další vývoj mají pouze ty oocyty, které se nacházejí těsně před vstupem do telofáze I. Pro dosažení úspěchu bude však nezbytné jinak zorganizovat podmínky pokusu.



V dalších několika pracích jsme se zaměřili na funkci jadérek (NPBs) v prvojádrech zygot a jejich úlohy v dalším vývoji embrya. Hodnocením jejich počtu a distribucí v prvojádrech jednobuněčných lidských embryí, jako kritérium pro úspěšnost dalšího vývoje, se zabývá řada prací. V podstatě se jedná o jednoduchou, neinvazivní metodu, která nevyžaduje žádné speciální přístroje a mohla by tak být používána i těch centrech, kde je vybavení na nižší úrovni. Je však nezbytné podotknout, že řada prací se s významem tohoto hodnocení vývojové schopnosti embryí neztotožnila. Příčinou mohlo být i to, že nebylo známo, jakou funkci by tato jadérka mohla mít.

Obecně se předpokládalo, že NPBs slouží jako úložiště materiálu, z něhož se postupně, během vývoje embrya, formují plně funkční jadérka. Naše práce (a další publikace - Kyogoku, Fulka, Jr., Wakayama, Miyano – Development) dokazuje, že tomu tak není. Jadérka mají význam pouze ve velmi krátkém období po oplození při remodelaci a transformaci chromatinu, které jsou nezbytné pro normální vývoj embrya.

Je tak zřejmé, že by bylo vhodné se k danému postupu znovu vrátit a precizní analýzou prvojader najít taková kritéria, která by umožnila neinvazivně hodnotit vývojový potenciál embrya. Pro přenos pak vybírat pouze ta, u nichž bude šance na implantaci co největší.

Z klinického hlediska je zřejmé, že extrapolace výsledků získaných u laboratorních zvířat, ale i hodnocení nadbytečného materiálu z center asistované reprodukce, přináší poznatky, které mohou být přímo nebo nepřímo využity v klinické praxi. Jistě by se našla řada dalších problémů, jejichž řešení by představovalo zajímavé náměty s potenciálním budoucím praktickým využitím.

## SEZNAM LITERATURY

### Úvod

1. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human - Sperm Cervical Mucus Interaction (World Health Organization, Geneva, ed. 5, 2010).
2. Grobstein, C. (1979) External human fertilization. *Sci. Am.* 240, 57-67.
3. Bergh, C. & Wennerholm, U.B. (2012) Obstetric outcome and long-term follow up of children conceived through assisted reproduction. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynecol.* 26, 841 - 852.
4. Palermo, G.P., Joris, H., Devroey, P. & Van Steirteghem, A.C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 8810, 17-18.
5. Palermo, G.P., Cohen, J., Alikani, M., Adler, A. & Rosenwaks, Z. (1995) Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil. Steril.* 6, 1231-1240.
6. Tesarik, J. & Greco, E. (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.* 14, 1318-1323.
7. Fulka, H., Mrazek, M. & Fulka, Jr., J. (2004) Nucleolar dysfunction may be associated with infertility in humans. *Fertil. Steril.* 82, 486-487.
8. Fulka, H. & Langerova, A. (2014) The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition. *Development* 141, 1694-704.
9. Kyogoku, H., Fulka, Jr., J., Wakayama, T. & Miyano, T. (2014) De novo formation of nucleoli in developing mouse embryo originating from enucleolated zygotes. *Development* 141, 2255-2259.
10. Wong, C.C., Loewke, K. E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C., Baer, T.M. & Reijo Pera., R.A. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predict development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28, 1115-1121.
11. Treff, N.R., Su, J., Tao, X., Northop L., E. & Scott, Jr., R.T. (2011) Single-cell whole-genome amplification technique impact the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 335-343.
12. Cobo, A. & Diaz, C. (2011) Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil. Steril.* 96, 227-285.

13. Cha, K.Y. & Chian, R.C. (1998). Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum. Reprod. Update* 4, 103-120.
14. Callaway, E. (2014) The power of three. *Nature* 509, 414-417.
15. Woods, D.C. & L Tilly, J. (2013) Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. *Nature Protocols* 8, 966-988.
16. Hayashi, K. & Saitou, M. (2013) Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 8, 1513-1524.
17. Jirtle, R.L. & Skinner, M.K. (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 253-262.

**I. An observational study of assisted reproductive technology outcomes in new European Union member states: an overview of protocols used for ovarian stimulation (Studie technologií asistované reprodukce v nových členských státech EU: přehled protokolů ovariální stimulace) *Curr. Med. Res. Opin.* 2010, 26, 819-825**

1. Grobstein, C. (1979) External human fertilization. *Sci. Am.* 240, 57 - 67.
2. Fauser, B.C. & Devroey, P. (2003) Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends Endocrin. Met.* 14, 236-242.
3. The ESHRE Capri Workshop Group. (1995) Anovulatory infertility. *Hum. Reprod.* 10, 1549-1553.
4. Sullivan, E.A, Zegers-Hochschild, F., Mansour R., Ishihara, O., de Mouzon., J., Nygren, K.G. & Adamson G.D. (2013) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2004. *Hum. Reprod.* 28, 1375-1390.
5. Baart, E.B, Maclon, N.S. & Fauser, B.J. (2009) Ovarian stimulation and embryo quality. *Reprod. Biomed. Online.* 18, 45-50.
6. Frydman, R., Howles, C.M. & Truong, F. (2000) A double-blind, randomized study to compare recombinant human follicle stimulating hormone (FSH, Gonal-F) with highly purified urinary FSH (Metrodin HP) in women undergoing assisted reproductive techniques including intracytoplasmic sperm injection. The French Multicentre Trialists. *Hum. Reprod.* 15, 520-525.

7. Fauser, B.C., Diedrich, K. & Devroey P. (2008) Predictors of ovaria response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum. Reprod. Update.* 14, 1-14.
8. Mardešić, T., Chládek, D., Kosařová, M. & Lonský P. (2013) Diagnostika a léčba poruch plodnosti. Praha: Grada Publishing (chapter 2, pp. 22-28).
9. Hohmann, F. P., Macklon, N. S. & Fauser, B. C. (2003) A randomised comparison of two ovarian gonadotropin-releasing hormone antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle stimulation hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long agonist protocol. *J. Clin. Endocr. Metab.* 88, 166-173.
10. Van Der Linden, M., Buckingham, K., Farquhar, C., Kremer, J. & Metwally, M. (2012) Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *Hum. Reprod. Update.* 18, 473.
11. Gilliam, M. L. (2011) Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Obstet. Gynecol.* 118, 706-707.

## **II. Chromatin acetylation in human oocytes (Acetylace chromatinu v humánních oocytech) *Ginekol Pol.* 2013, 84, 263-267**

1. Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662-673.
2. Akiyama, T., Nagata, M. & Aoki, F. (2006) Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *PNAS USA* 103, 7339-7344.
3. Kim, J.M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M. & Aoki, F. (2003) Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J. Cell. Biol.* 162, 37-46.
4. Huang, J.C., Yan, L.Y., Lei, L.Y., Lei, Y.L., Miao, Y.L., Shi, L.H., Yang, J.W., Wang, Q., Ouyang, Q., Sun, Q.Y. & Chen, D.Y. (2007) Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 77, 666-670.
5. Wang, Q., Yin, S., Ai, J.S., Liang, C.G., Hou, Y., Chen, D.Y., Schatten, H. & Sun, Q.Y. (2006) Histone deacetylation is required for orderly meiosis. *Cell Cycle* 5, 766-774.
6. Endo, T., Naito, K., Aoki, F., Kume, S. & Tojo, H. (2005) Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 123-128.
7. Tang, L.S., Wang, Q., Xiong, B., Hou, Y., Zhang, Y.Z., Sun, Y.Z. & Wang, A.Y. (2007) Dynamic changes in histone acetylation during sheep oocyte maturation. *J. Reprod. Dev.* 53, 555-561.

8. Nagaoka, S.I., Hassold, T.J. & Hunt, P.A. (2012) Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.* 13, 493-504.
9. Selesniemi, K., Lee, H.J., Mulhauser, A. & Tilly, J.L. (2011) Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *PNAS USA* 108, 12319-12324.
10. Fulka, H. (2007) Changes in global histone acetylation pattern in somatic cell nuclei after their transfer into oocytes at different stages of maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 556-564.
11. van den Berg, I.M., Evelend, C., van der Hoeven, M., Birnie, E., Steegers, E.A.P., Galjaard, R.J., Laven, J.S.E. & van Doorninck, J.H. (2011) Defective deacetylation of histone4 K12 in human oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. *Hum. Reprod.* 26, 1181-1190.
12. Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, M.M., Tipner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.S., Sritanaudomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D., Sadler-Fred, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stoufer, R.L., Wolf, D. & Mitalipov, S. (2013) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228-1238.
13. Stojkovic, M. (2005) Derivation of human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11, 226-231.
14. Heindryckx, B., De Sutter, P., Gerris, J., Dhont, M. & Van der Elst, M. (2007) Embryo development after successful somatic cell nuclear transfer to in vitro matured human germinal vesicle oocytes. *Hum. Reprod.* 2007, 1982-1990.
15. Fulka, H., Langerova, A., Barnetova, I., Novakova, Z., Mosko, T. & Fulka, Jr., J. (2009) How to repair the oocyte and zygote? *J. Reprod. Dev.* 55, 583-587.

### **III. Pluripotent stem cells from maturing oocytes (Pluripotentní kmenové buňky ze zrajících oocytů) *Cell Reprogramm.* 15, 389-393(2013)**

1. Smith, A.G. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17,435-462.
2. Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2013) Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development* 140, 2457-2461.

3. Obokata, H., Wakayama, T., Sasai, Y., Kojima, K., Vacanti, M.P., Niwa, H., Yamato, M. & Vacanti, C.A. (2014) Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 505, 641-647.
4. Zhang, S. & Teng, Y. (2013) Powering mammalian genetic screen with mouse haploid embryonic stem cells. *Mutation Res.* 741-2, 44-50.
5. Pera, M. & Trounson, A.O. (2004) Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* 131, 5515-5525.
6. Mai, Q., Yu, Y., Li, T., Wang, L., Chen, M., Huang, S., Zhou, C. & Zhou, Q. (2007) Derivation of human embryonic stem cells from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res.* 17, 1008-1019.
7. McLaren, A. (2007) A scientist's view of the ethics of human embryonic stem cell research. *Cell Stem Cell* 1, 23-26.
8. Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, M.M., Tipner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.S., Sritanandomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D., Sadler-Fred, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stoufer, R.L., Wolf, D. & Mitalipov, S. (2013) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228-1238.
9. Ware, C., Nelson, A.M., Mecham, B., Hesson, J., Zhou, W., Jonlin, E.C., Jimeney-Caliani, A.J., Deng, X., Cavanaugh, C., Cook, S., Tesar, P.J., Okada, J., Margaretha, L., Sperber, H., Choi, M., Blau, C.A., Treuting, P.M., Hawkins, R.D., Cirulli, V. & Ruohola-Baker, H. (2014) Derivation of naïve human embryonic stem cells. *PNAS USA* 111, 4484-4489.
10. Fulka, Jr., J., First, N.L., Fulka, J. & Moor, R.M. (1999) Checkpoint control of the G2/M phase transition during the first mitotic cycle in mammalian eggs. *Hum. Reprod.* 14, 1582-1587.
11. Fulka, H., Hirose, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Wakisaka, N., Matoba, S., Ogura, A., Mosko, T., Kott, T. & Fulka, Jr., J. (2011) Production of mouse embryonic stem cell lines from maturing oocytes by direct conversion of meiosis into mitosis. *Stem Cells* 29, 517-527.
12. Stojkovic, M. (2005) Derivation of human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11, 226-231.
13. Heindryckx, B., De Sutter, P., Gerris, J., Dhont, M. & Van der Elst, M. (2007) Embryo development after successful somatic cell nuclear transfer to in vitro matured human germinal vesicle oocytes. *Hum. Reprod.* 2007, 1982-1990.

14. Li, R. & Albertini, D.F. (2013) The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 141-152.
15. Lerou, P.H., Yabuuchi, A., Huo, H., Takeuchi, A., Shea, J., Cimini, T., Ince, T.A., Ginsburg, E., Racowsk, C. & Daley, G.Q. (2008) Human embryonic stem cell derivation from poor quality embryos. *Nat. Biotechnol.* 26, 212-214.
16. Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S.J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., Krtolica, A. & Lanza, R. (2008) Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction, *Cell Stem Cell* 2, 113-117.
17. Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.J. & Lanza, R. (2006) Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485.

**IV. Production of giant mouse oocyte nucleoli and assessment of their protein content (Produkce gigantických jadérek izolovaných z oocytů myši a stanovení jejich obsahu proteinů). *J. Reprod. Dev.* 58, 371-376 (2012)**

**The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition (Klíčová role jadérek oocytů při regulaci funkce satelitů centromer v průběhu přechodu ze stádia oocytu na embryo). *Development* 141, 1694-1704 (2014)**

1. Hou, Y., Fan, W., Yan, L., Li, R., Lian, Y., Huang, J., Li, J., Xu, L., Tang, F., Xie, X.S. & Quiao, J. (2013) Genome analyses of single human oocyte. *Cell* 155, 1492-1506.
2. Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M. & Pera, R.A.R. (2010) Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28, 1115-1121.
3. Tesarik, J. & Greco, E. (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.* 14, 1318-1323.
4. Nicoli, A., Palomba, S., Capodanno, F., Fini, M., Falbo, A. & La Sala, G.B. (2013) Pronuclear morphology evaluation for fresh in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a systematic review. *J. Ovarian Res.* 6, 64.
5. Montag, M. & van der Ven, H. (2001) Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum. Reprod.* 11, 2384-2398.

6. Berger, D.S., Zapantis, A., Mehri, Z., Younger, J., Polotsky, A.J. & Jindal, S.K. (2014) Embryo quality but not the pronuclear score is associated with clinical pregnancy following IVF. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 279-283.
7. Lam, Y. W., Trinkle-Mulcahy, L. & Lamond, A.I. (2005) The nucleolus. *J. Cell Sci.* 118, 1335-1337.
8. Clift, D. & Schuh, M. (2013) Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 14, 549-562.
9. Monti, M., Zanoni, M., Calligaro, A., Ko, M.S.H., Mauri, P. & Redi, C.A. (2013) Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes. *Biol. Reprod.* 88, 1-7.
10. Fulka, Jr., J., Moor, R.M., Loi, P. & Fulka, J. (2003) Enucleation of porcine oocytes. *Theriogenology* 59, 1879-1885.
11. Fulka, H., Mrazek, M. & Fulka, Jr., J. (2004) Nucleolar dysfunction may be associated with infertility in humans. *Fertil. Steril.* 82, 486-487.
12. Ogushi, S., Palmieri, C., Fulka, H., Saitou, M., Miyano, T. & Fulka, Jr., J. (2008) The maternal nucleolus is essential for early development in mammals. *Science* 319, 613-616.
13. Ogushi, S. & Saito, M. (2010) The nucleolus in the mouse oocyte is required for the early step of both female and male pronucleus organization. *J. Reprod. Dev.* 56, 495-501.
14. Fulka, Jr., J., Langerova, A., Loi, P., Martinkova, S. & Fulka, H. (2011) Transplantation of nucleoli into human zygotes: not as simple as expected? *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 385-389.
15. Fulka, H. & Fulka, Jr., J. (2010) Nucleolar transplantation in oocytes and zygotes: challenges for further research. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 63-67.



## Seznam publikací:

Fulka, H. & **Langerova, A.** (2014) The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition. *Development* 141(8):1694-704.

**Langerova, A.**, Fulka, H. & Fulka, J., Jr. (2013) Somatic cell nuclear transfer-derived embryonic stem cell lines in humans: pros and cons. *Cell Reprogramm.* 15(6):481-3.

**Langerova, A.**, Fulka, H., Fulka, Jr., J. (2013) Pluripotent stem cells from maturing oocytes. *Cell Reprogramm.* 15(5):389-93.

Fulka, Jr., J, **Langerova, A.**, Loi, P., Ptak, G., Albertini, D. & Fulka, H. (2013) The ups and downs of somatic cell nucleus transfer (SCNT) in humans. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30(8):1055-8.

**Langerova, A.** (2013) Chromatin acetylation in human oocytes. *Ginekol. Pol.* 84(4):263-7.

Fulka, H., Martinkova, S., Kyogoku, H., **Langerova, A.** & Fulka, Jr., Jr. (2012) Production of giant mouse oocyte nucleoli and assessment of their protein content. *J. Reprod. Dev.* 58(3):371-6.

Fulka, Jr., J., **Langerova, A.**, Loi, P., Martinkova, S. & Fulka, H. (2011) Transplantation of nucleoli into human zygotes: not as simple as expected? *J. Assist. Reprod. Genet.* 28(5):385-9.

Vlaisavljević, V., Meden-Vrtovec, H., Lewandowski, P., Radwan, M., **Langerova, A.**, Vicena, M., Války, J., Herman, M., Usoniene, A. & Treijs, G. (2010) An observational study of assisted reproductive technology outcomes in new European Union member states: an overview of protocols used for ovarian stimulation. *Curr. Med. Res. Opin.* 26(4):819-25.

Fulka, H., **Langerova, A.**, Barnetova, I., Novakova, Z., Mosko, T. & Fulka, Jr., J. How to repair the oocyte and zygote? *J. Reprod. Dev.* 55(6):583-7.

## **Prohlášení k příspěví předkladatele PhD. thesí k předloženým publikacím**

Fulka, H., **Langerova, A.**, Barnetova, I., Novakova, Z., Mosko, T. & Fulka, Jr., J. How to repair the oocyte and zygote? J. Reprod. Dev. 55(6):583-7.

*(příprava článku, diskuze k problémům humánní ART)*

Vlaisavljević, V., Meden-Vrtovec, H., Lewandowski, P., Radwan, M., **Langerova, A.**, Vicena, M., Války, J., Herman, M., Usoniene, A. & Treijs, G. (2010) An observational study of assisted reproductive technology outcomes in new European Union member states: an overview of protocols used for ovarian stimulation. Curr. Med. Res. Opin. 26(4):819-25.

*(příprava pacientek, kolekce oocytů, vyhodnocení studie, příprava článku)*

Fulka, Jr., J., **Langerova, A.**, Loi, P., Martinkova, S. & Fulka, H. (2011) Transplantation of nucleoli into human zygotes: not as simple as expected? J. Assist. Reprod. Genet. 28(5):385-9.

*(příprava článku a jeho odeslání)*

Fulka, H., Martinkova, S., Kyogoku, H., **Langerova, A.** & Fulka, Jr., Jr. (2012) Production of giant mouse oocyte nucleoli and assessment of their protein content. J. Reprod. Dev. 58(3):371-6.

*(kolekce NPBs, produkce giga NPBs)*

**Langerova, A.** (2013) Chromatin acetylation in human oocytes. Ginekol. Pol. 84(4):263-7.

*(stimulace pacientek, kolekce oocytů a jejich immuno-značení, sepsání a odeslání publikace)*

Fulka, Jr., J., **Langerova, A.**, Loi, P., Ptak, G., Albertini, D. & Fulka, H. (2013) The ups and downs of somatic cell nucleus transfer (SCNT) in humans. J. Assist. Reprod. Genet. 30(8):1055-8.

*(příprava článku a jeho odeslání)*

**Langerova, A.**, Fulka, H., Fulka, Jr., J. (2013) Pluripotent stem cells from maturing oocytes. Cell Reprogram. 15(5):389-93.

*(stimulace pacientek, kolekce oocytů a jejich ošetření BL 1)*

**Langerova, A.**, Fulka, H. & Fulka, J., Jr. (2013) Somatic cell nuclear transfer-derived embryonic stem cell lines in humans: pros and cons. Cell Reprogram. 15(6):481-3.

*(příprava článku)*

Fulka, H. & **Langerova, A.** (2014) The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition. Development 141(8):1694-704.

*(manipulace oocytů, enukleolace, immuno-značení, FISH, příprava článku)*

Praha, 13.8. 2014

Josef Fulka, Jr.

*(za všechny spoluautory)*

## **PŘÍLOHY**