

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Světlana Žabková

Mechanismus a rizikové faktory vzniku monozygotických dvojčat u savců
Mechanism and risk factors for the development of monozygotic twins in mammals

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V dne

Podpis autora

Poděkování:

Můj největší dík patří mému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimírovi Krylovovi, Ph.D. za jeho trpělivost, cenné rady, ochotu a čas, který mi během psaní této závěrečné práce věnoval. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a nejbližším, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali.

Abstrakt

Monozygotická dvojčata jsou výsledkem rozdělení embrya během časného embryonálního vývoje. Vývojové stádium, ve kterém nastane rozdělení, je klíčovým faktorem určujícím stupeň sdílení plodových obalů. Etiologie a mechanismus vzniku monozygotických dvojčat nejsou zatím zcela objasněny. K pravidelnému přirozenému výskytu monozygotických vícečetných těhotenství dochází mezi savci pouze u člověka a dvou druhů pásovců, *Dasybus novemcinctus* a *Dasybus hybridus*. Spontánní výskyt u člověka se uvádí jako 0,45 % všech narozených. Se vzrůstajícím zájmem o metody asistované reprodukce ale roste i frekvence těhotenství s monozygotickými dvojčaty. V jistém ohledu lze monozygotická dvojčata také chápat jako vážný vedlejší efekt léčby neplodnosti, neboť monozygotická dvojčata se vyznačují mnohem vyšší prenatální mortalitou, předčasnými porody a vrozenými anomáliemi než jednočetná těhotenství. Tato bakalářská práce si pokládá za cíl shrnout získané poznatky o vzniku monozygotických dvojčat u savců. Rovněž se snaží diskutovat potenciální mechanismy a rizikové faktory, které mohou ovlivnit jejich vznik. Monozygotická dvojčata jsou důležitým modelem pro objasnění genetické predispozice řady onemocnění. Práce také v krátkosti naznačí, jakými způsoby lze monozygotická dvojčata experimentálně produkovat.

Klíčová slova: monozygotická dvojčata, metody asistovaná reprodukce, rizikové faktory, rozdělení

Abstract

Monozygotic twins result from the splitting of one embryo in early embryonic development. The developmental stage, in which the splitting occurs, is the main factor determining the degree of sharing fetal sacs. The etiology and mechanism of monozygotic twinning are still unknown. The human and two species of armadillo, *Dasypus novemcinctus* and *Dasypus hybridus* are the only mammals that regularly produce monozygotic multiple pregnancies. The spontaneous occurrence of monozygotic twinning is 0,45 % of all births. The monozygotic twin pregnancies have been reported to occur at a higher rate following the increasing interest of assisted reproduction technologies. In certain consideration, we understand them as a side effect of infertility treatment because monozygotic twins result in a higher rate of prenatal mortality, premature birth and congenital anomalies than singleton pregnancies. This bachelor thesis aims to summarize knowledge about the formation of monozygotic twins in mammals. Also, it tries to discuss potential mechanisms and risk factors which could influence their formation. Monozygotic twins are an important model for explaining the genetic predisposition of some diseases. The thesis also introduces the ways of experimental production of monozygotic twins.

Keywords: monozygotic twins, assisted reproduction technologies, risk factors, splitting

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Historický vývoj modelu.....	2
3. Mechanismus vzniku monozygotických dvojčat.....	3
4. Přírozený výskyt monozygotických dvojčata u savců.....	6
5. Faktory ovlivňující vznik monozygotických dvojčat	7
5.1. Asistovaná reprodukce	7
5.1.1. Ovariální stimulace	7
5.1.2. Kultivační médium	9
5.1.3. Přenos embryí.....	10
5.1.4. Mikromanipulační techniky	11
5.1.5. Věk matky	12
5.2. Genetika.....	13
6. Další možné mechanismy vzniku monozygotických dvojčat	14
6.1. Hypotéza o existenci kodominantní osy.....	14
6.2. Hypotéza o odpuzování buněk.....	15
7. Experimentální indukce monozygotických dvojčat u savců.....	15
7.1. Teratogenní látky.....	15
7.2. Separace blastomer a bisekce moruly/blastocysty	16
8. Závěr	18
9. Použitá literatura.....	20

1. Úvod

Monozygotická dvojčata (MZ) vzbuzují pozornost od nepaměti, jak v laických, tak odborných kruzích. Dnes již víme, že MZ dvojčata vznikají rozdělením jednoho embrya na dva téměř identické jedince v rané fázi embryonálního vývoje, na rozdíl od dizygotických (DZ) dvojčat, která jsou výsledkem oplodnění dvou oddělených oocytů dvěma samostatnými spermii v rámci jedné ovulace. U MZ dvojčat je kritickým faktorem načasování rozdělení embrya a odráží se v následném vývoji plodových obalů amnionu a chorionu. Stupeň sdílení těchto obalů mezi dvojčaty zvyšuje riziko komplikací během těhotenství a může skončit i úmrtím plodu.

Etiologie a podstata molekulárního mechanismu vzniku MZ dvojčat je stále předmětem bádání. Studium embryonálního vývoje MZ dvojčat se zabývá nespočet vědeckých týmů, neboť pochopení těchto mechanismů se zdá být klíčové pro vysvětlení řady vrozených vývojových vad, které postihují dvojčata mnohem více než jedince z jednočetného těhotenství.

U savců se MZ dvojčata vyskytují vzácně. Výjimku tvoří pouze člověk a dva druhy pásovce. Pravděpodobnost spontánního početí MZ dvojčat u lidí je přibližně 0,45 %. Se vzrůstajícím zájmem o metody asistované reprodukce (ART) dochází ale k několikanásobnému navýšení procenta početí MZ dvojčat. Léčba neplodnosti pomáhající neplodným párům dosáhnout vytouženého dítěte zasahuje do přirozeného početí a ovlivňuje také časný embryonální vývoj. Napomáhá k nárůstu vícečetných těhotenství, která znamenají komplikace jak pro matku, tak pro plod.

Mezi hlavní faktory hrající roli ve zvýšeném výskytu MZ dvojčat po asistované reprodukci patří hormonální stimulace, věk matky, kultivační podmínky, přenos blastocysty či mikromanipulace se *zona pellucida* (ZP) oocytu. Jistou roli mohou hrát i dědičné faktory.

Tato bakalářská práce si pokládá za cíl shrnout získané poznatky o vzniku MZ dvojčat u savců. Rovněž se snaží diskutovat potenciální mechanismy a odhalit rizikové faktory, které mají vliv na výskyt těchto dvojčat. Je také na místě představit, jakými způsoby lze indukovat vznik MZ dvojčat.

2. Historický vývoj modelu

V roce 1922 americký lékař a embryolog George W. Corner vydal článek, který se zabýval ranými embryonálními stádii monochorionických dvojčat u prasat. Data, která zveřejnil nebyla nová, ale způsob jak s nimi nakládal, dal vznik myšlenky, že načasování rozdělení embryí má vliv na strukturu plodových obalů u dvojčat (Corner 1922, cit. dle Herranz, 2013). O deset let později také byla označena za nepravdivou představa, že dichorionická diamniotická dvojčata mohou patřit pouze mezi DZ dvojčata (Verschuer, 1932). Dalším bádáním bylo zjištěno, že se amnion osmý den po oplození začíná delaminací oddělovat od sousedního trofoblastu a postupně během pěti dní uzavírá konkávní prostor nad zárodečným diskem za vzniku amniotické dutiny (Hertig, 1945). Pokud se zárodečný disk během této doby rozdělí, dojde ke vzniku dvou embryí uvnitř jednoho amnionu. Naopak pokud by došlo k rozdělení zárodečného listu před vytvořením amnionu, pravděpodobně by se jako odezva na přítomnost dvou embryí vytvořily dva amniony (Coulton et al., 1947).

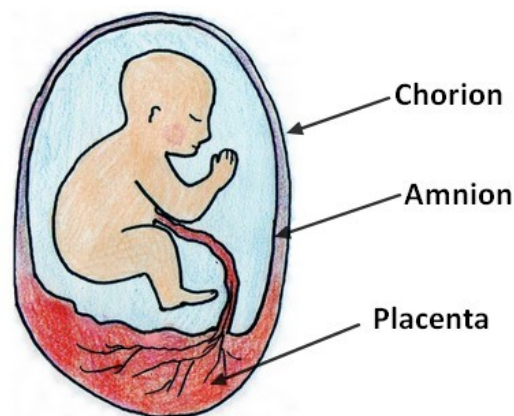
Na základě předešlých zjištění Corner v roce 1955 svůj model o embryologii lidských dvojčat aktualizoval a zveřejnil. Jeho práce mimo jiné obsahovala i pět mikrofotografií fází vývoje odpovídající dobám, kdy ke vzniku dvojčat může dojít: dvoubuněčné stádium (asi 2. den po oplození), stádium moruly (asi 4. den), stádium blastocysty (asi 5. den), implantované embryo (11. den) a pozdější embryo (asi 17. den). Poté provedl analýzu tří kritických fází vývoje (Corner, 1955). Navzdory nedostatku přímých důkazů, byl model přijat jako prokázaný.

V roce 2013 Gonzalo Herranz zveřejnil názor, že by tento model neměl být prezentován jako spolehlivý záznam pozorovaných faktů, nýbrž pouze jako hypotetický koncept. Argumentoval tím, že koexistence dvou embryí uvnitř jedné ZP, aniž by nedošlo k fúzi, je nemožné, a že postzygotické rozdělení se postupem času stává nepravděpodobné. Také zatím nikdo přesně nepozoroval a nezaznamenal rozdělení vnitřní buněčné masy (ICM) na dvě části. Model byl podle něj neadekvátní, neboť nebyl schopný vysvětlit některé případy vzniku dvojčat po ART. Navrhl tedy vlastní teorii, která předpokládala, že výsledkem prvního dělení během rýhování jsou MZ dvojčata (nikoliv dvě blastomery) a zároveň, že struktura plodových obalů nezávisí na rozdělení embrya, ale na různých způsobech fúze embryí dvojčat uvnitř ZP (Herranz, 2013).

Denker (2013) ve svém komentáři zdůraznil, že prokázání tradičního modelu rozdělení zygoty je omezoáno problematikou z etického hlediska. Možnou příčinou neschopnosti pozorovat spontánní rozdělení během oplodnění *in vitro* je povaha ZP. Ta je silnější a chrání embryo po delší dobu než v podmínkách *in vivo*.

3. Mechanismus vzniku monozygotických dvojčat

MZ dvojčata jsou *in vivo* považována za relativně vzácná. Jejich výskyt se uvádí jako 0,45 % procent všech narozených (Derom et al., 1987). Podle epidemiologických dat je výskyt MZ konstantní napříč populací a jejich frekvence v populaci je 3 na 1000 těhotenství (Tong et al. 1997). Přesný mechanismus vzniku MZ dvojčat však zůstává předmětem bádání. V současnosti uznávaný model definuje MZ dvojčata jako výsledek rozdělení jednoho embrya na dva jedince. Vývojové stádium, ve kterém nastane rozdělení, je klíčovým faktorem určující chorionicitu a amnionicitu. Chorion je vnější obal embrya, který vzniká diferenciací trofoblastu a spolu s placentou tvoří rozhraní plodu a matky. Pokud dvojčata sdílí chorion, budou sdílet i placentu. Vnitřní obal embrya tvoří pětivrstevný amnion, který je odvozen od ICM. Nejvnitřnější vrstva produkuje plodovou vodu. Ta chrání plod před vnějšími nárazy a vysycháním (viz obrázek 1) (Carlson, 2014).



Obrázek 1: Znázornění chorionu, amnionu a placenty u jednočetného těhotenství. V případě vícečetných těhotenství může docházet ke sdílení těchto částí (vlastní zpracování).

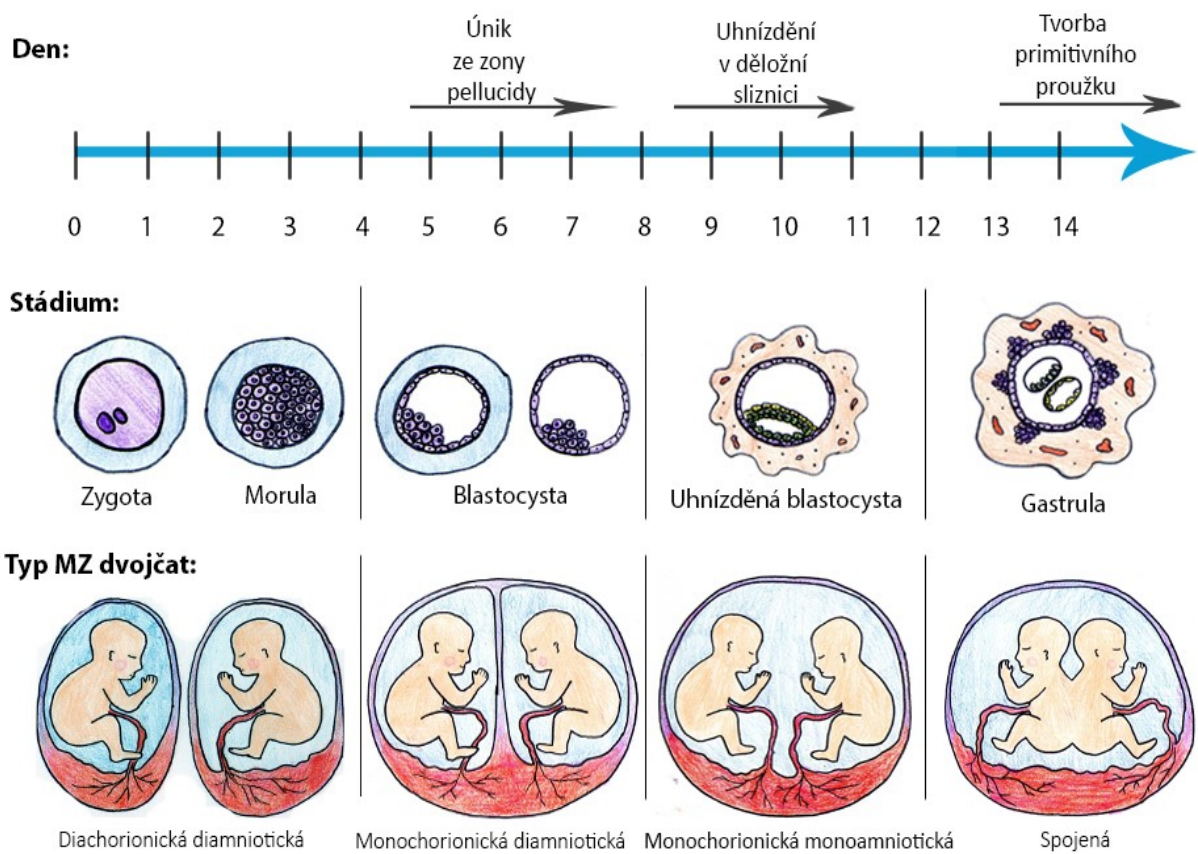
Pokud rozdělení embrya nastane do 4 dnů po oplodnění ve stádiu moruly, vznikají dichorionická diamniotická dvojčata. Každý jedinec má vlastní placentu i amnion (viz obrázek 2). Dichorionická diamniotická dvojčata tvoří zhruba 20 % ze všech případů MZ dvojčat *in vivo* (Sobek et al., 2016).

Rozdělení embrya během 4.-8. dne po oplození ve stádiu blastocysty dává vznik monochorionickým diamniotickým dvojčatům. Jedinci mají vlastní amniony, avšak sdílejí placentu (viz obrázek 2). Monochorionická diamniotická dvojčata jsou nejčastější z MZ dvojčat, neboť se vyskytují v 75 % všech případů *in vivo* (Sobek et al., 2016).

Monochorionická monoamniotická dvojčata vznikají, pokud k rozdělení ICM dochází během 8.-12. dne, tedy v době, kdy se blastocysta uhnízdila v děložní sliznici. Jedinci sdílejí jak placentu, tak amnion (viz obrázek 2) (Sobek et al., 2016). U tohoto typu dvojčat hrozí zvýšená pravděpodobnost výskytu komplikací jako je twin-to-twin transfuzní syndrom, zapletení pupečních šňůr, předčasný porod nebo další vrozené malformace (Cordero et al., 2006).

Za vznikem spojených dvojčat stojí neúplné rozdělení embryonální osy. K rozdělení dochází po 12. dnu po oplození. Vlivem vyvíjejícího se primitivního pruhu dvojčata sdílí kromě placenty a amnionu i části těla a orgánů (viz obrázek 2) (Kaufman, 2004). Výskyt spojených dvojčat u lidí je 1,47 na 100 000 narozených (Mutchinick et al., 2011). Kromě výše zmíněné teorie rozdělení vysvětlující jejich vznik se objevila i teorie fúze. Spencer (1992) zastával názor, že fúze dvou samostatných embryí je jediný embryologický proces, kterým můžeme vysvětlit specifická místa spojení spojených dvojčat. Za výjimku považoval spojená dvojčata typu parapagus, která by mohla vzniknout s minimální duplikací ze dvou téměř paralelních chord na jednom embryonálním disku, s různým stupněm rostrální separace. Kaufman (2004) namítnul, že pokud by platila fúzní teorie, musela by být všechna MA dvojčata zrcadlovou kopií svého dvojčete. Pokud se tento jev vyskytuje častěji u spojených dvojčat než u samostatných MZ dvojčat, nelze tuto teorii považovat za platnou.

Spojená dvojčata lze klasifikovat podle místa spojení na ventrálně (omphalopagus, thoracopagus, cephalopagus, ischiopagus, parapagus) a dorsálně spojená (craniopagus, rachipagus, pygopagus). Spencer (2000) navrhl takzvaně sférickou teorii, podle které dorsálně spojená dvojčata pochází ze dvou embryonálních disků dorsálně orientovaných uvnitř amniotické dutiny. Naopak ventrálně spojená dvojčata pochází ze dvou embryonálních disků plující na sféře sdíleného žloutkového vaku.



Obrázek 2: Schématické znázornění, které ukazuje, jak načasování rozdělení embrya ovlivní, jaký typ MZ dvojčat vzniká (vlastní zpracování).

4. Přirozený výskyt monozygotických dvojčat u savců

Studium MZ dvojčat je limitováno nedostatkem zvířecích modelů. K pravidelnému přirozenému výskytu MZ dvojčat dochází mezi savci pouze u dvou druhů pásovců (Armandillo). Miguel Fernandez zkoumal výskyt více embryí stejného pohlaví v děloze pásovce devítipásého (*Dasypus novemcinctus*). Embrya sdílela společný chorion, ale každé embryo mělo svůj vlastní amnion. Rozdělení jednoho oocyta na více embryí předcházelo obrácení žloutkového vaku (Fernandez 1909, cit. dle Carter, 2018). Specifickou polyembronii popsali jeho současníci Newman a Patterson i u pásovce jižního (*Dasypus hybridus*) (Newman a Patterson, 1909). Další zvláštností embryonálního vývoje zmíněných druhů pásovců je opožděná implantace. K rozmnožování dochází od května do června, 5–7 dní po oplodnění blastocysta vstupuje do dělohy a zde se vývoj pozastavuje. K implantaci dochází až v listopadu poté, co se trofoblastické buňky stávají opět aktivními (Hamlett, 1935). Během pozdějších implantačních fází rozšiřující se exocelom tlačí amnion směrem k epiblastické destičce. Separaci epiblastické destičky dochází nejprve ke vzniku dvou embryonálních štítů, načež následuje vznik dalších dvou embryonálních štítů. Rozsáhlý amnion je postupně exocelomem omezen na amniotické kanálky spojující embrya a malý společný amniotický váček na vrcholu původní epiblastické destičky. Poté co se embryonální štíty zcela oddělí a částečně se přeruší amniotické spojení, vytváří se primitivní pruhu následované somitovým vývojem. Embrya s tenkými amniotickými membránami jsou orientována kraniálními konci směrem k děložnímu hrdlu. Kvůli zvětšování exocelomu a dělohy se embrya nachází s rovnoměrným rozstupem od sebe (Enders, 2002a).

Pokud bychom předpokládali, že za rozdělením embrya stojí opožděná implantace, musela by být MZ dvojčata pozorována i u jiných druhů s embryonální diapauzou. Vhodnějším vysvětlením je, že si pásovcí zvýšením počtu potomků zajišťují reprodukční výhodu. Ačkoliv stejný princip nebude příčinou MZ dvojčat u člověka, byl zaznamenán případ, kdy došlo k rozdělení epiblastické destičky i u primátů. Zásadním faktorem rozdělení embryonálního štítu u embrya makaka během 15. dne těhotenství se zdál být pozdní vývoj embrya ve srovnání s vývojem placenty a exocelomu. Potvrzovalo to tak, že ke vzniku MZ dvojčat u primátů může dojít před tvorbou primitivního pruhu (Enders, 2002b).

5. Faktory ovlivňující vznik monozygotických dvojčat

5.1. Asistovaná reprodukce

Nejdůležitějším aspektem, který má vliv na vznik MZ dvojčat u lidí je ART, jejíž souvislost s vícečetným těhotenstvím byla poprvé popsána už v roce 1984 (Yovich et al., 1984). MZ dvojčata lze v jistém ohledu také chápat jako vážný vedlejší efekt léčby neplodnosti, neboť MZ dvojčata se vyznačují mnohem vyšší prenatalní mortalitou a plodovými abnormalitami než jednočetná těhotenství (Livingston a Poland, 1980). Monochorionická monoamniotická dvojčata patří mezi nejrizikovější skupinu. Přestože ve spontánních početech jsou relativně vzácná, podle údajů Alikani et al. (2003) je jejich výskyt po ART až 37%. Výskyt MZ dvojčat po ART uváděný v řadě prací ale není zcela tak přesný. Některé studie při analýze vlivu ART na výskyt MZ dvojčat vychází pouze z ultrasonografického vyšetření prováděného během prvního trimestru těhotenství, které zahrnuje mimo jiné i určení chorionicity a amnionicity. MZ dichorionická dvojčata stejného pohlaví mohou být mylně zahrnuta mezi DZ dvojčata. Dále je spekulativní použití Weinbergova diferenciálního pravidla, které je založeno na předpokladu, že frekvence DZ dvojčat v populaci je rovna dvojnásobnému počtu dvojčat stejného pohlaví. Odečtením tohoto počtu od celkového počtu dvojčat získáme MZ dvojčata. Jedná se tedy o užitečné pravidlo, nemělo by se stát ale základem pro určení skutečného výskytu MZ dvojčat. Jako řešení se nabízí kompletní určení zygotity. Ultrazvukovým vyšetřením v prvním trimestru by byla stanovena chorionicita u všech iatrogenních těhotenství a dvojčata stejného pohlaví by následně v šestinedělí postoupila ještě genetické testování (Blickstein, 2005).

5.1.1. Ovariální stimulace

Kontrolovaná ovariální stimulace je metoda, jejímž cílem je získat dostatečný počet kvalitních oocytů, které jsou základem pro úspěch léčby neplodnosti. Nejpoužívanějším způsobem ovariální stimulace je tzv. dlouhý protokol s agonisty GnRH (GnRH-a) v časně folikulární nebo střední luteální fázi cyklu před plánovaným IVF. GnRH-a tlumí funkci hypofýzy a tím potlačují i pacientčinu sekreci luteinizačního hormonu a folikulostimulačního hormonu (FSH). Následná stimulace gonadotropiny zvyšuje folikulární růst. Obdobně funguje i tzv. krátký protokol s GnRH-a. Tento způsob využívá rychlého vzestupu sekrece pacientčina FSH na základě stimulace GnRH-a. Alternativou může být protokol s antagonisty GnRH. Díky absenci počátečního stimulačního efektu okamžitě potlačí sekreci gonadotropinů. V minulosti

se také hojně používal díky svým antiestrogenním vlastnostem klomifen-citrát. Jeho nevýhodou byla častá předčasná ovulace (shrnutí v Hugues, 2002).

První studií, jež prokázala vliv uměle indukované ovulace na frekvenci MZ dvojčat, byla populační studie ve východních Flandrech v Belgii v letech 1978 až 1985. Derom et al. (1987) odhalili významně vyšší četnost rozdělení zygoty pozorované při léčbě klomifen citrátem a gonadotropiny (1,2 %), než byla očekávaná frekvence rozdělení po spontánní ovulaci (0,45 %). Další studie dospěla k závěru, že kontrolovaná stimulace vaječnicků a indukce ovulace gonadotropinovou terapií ovlivňuje frekvenci MZ dvojčat mnohem výrazněji než jiné postupy ART. Pro představu, výskyt MZ dvojčat po indukci ovulace nebo stimulaci ovaria v této studii činil 1,5 %, zatímco výskyt MZ dvojčat po konvenčním *in vitro* oplodnění (IVF) byl 0,95 % (Schachter, 2001). Novorozeneckou studii srovnávající vliv samostatné stimulace ovaríí ku kontrolní skupině provedli Källén et al. (2002), kteří potvrdili, že i pouhá stimulace bez následného IVF zvyšuje frekvenci vícečetných porodů. Četnost MZ dvojčat ve srovnání s kontrolní skupinou byla téměř dvojnásobná. Pozdější analýza údajů z populačního prospektivního průzkumu ve východních Flandrech naznačuje, že větší podíl MZ dvojčat byl zaznamenán u pacientek s klomifen-citrátem jako jediné léčby ve srovnání s pacientkami s jinými látkami zvyšující ovulaci (Derom et al., 2006).

Derom et al. (1987) navrhli, že ovariální stimulace pravděpodobně mění mechanické vlastnosti ZP a tím dochází k jejímu abnormálnímu zpevnění. Tento proces neprobíhá ale na všech místech ZP rovnoměrně a vznikají místa, kterými může blastocysta vyhrěznout. Poté, co část blastocysty unikne ze ZP a část je stále uvnitř, může dojít k rozdělení. Jedním z výsledků jejich studie bylo, že frekvence rozdělení zygoty byla mnohem vyšší u trojčat než dvojčat. Předpokládali tedy, že zvýšení dávky hormonálních léků zvýší, jak počet trojčat, tak i frekvenci. Celá tato hypotéza vycházela z předchozí studie změn ZP myších oocytů, během které bylo zjištěno, že ZP přirozeně ovulovaných oocytů byla výrazně náchylnější na rozpouštění α -chymotrypsinem než u superovulovaných oocytů (Longo, 1981).

Studie Blickstein a Keith (2007) naznačila, že existuje subpopulace oocytů, která má vrozené nespecifické sklony podstoupit rozdělení zygoty po oplodnění. Ovariální stimulace tedy pouze zvýší pravděpodobnost, že jsou tyto oocyty dostupné a dají vznik MZ dvojčatům. Čím větší intenzita stimulace, tím větší je šance na přítomnost oocytů náchylných k rozdělení po ovulaci.

Dalším možným vysvětlením je, že ovariální stimulace negativně ovlivňuje embryonální preimplantační vývoj, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. *In vitro* myši blastocysta ovlivněná hormonální stimulací začala opouštět ZP daleko později než blastocysta z přirozené

ovulace. Ve srovnání s kontrolou z přirozeného cyklu došlo *in vivo* v preimplantačním vývoji myších blastocyst k opožděné formaci blastocysty, jejímu úniku ze ZP a následnému zvětšení. Takto ovlivněné blastocysty se vyvíjely abnormálně (Van der Auwera, 2001).

5.1.2. Kultivační médium

Zvolení vhodného kultivačního média je základem pro úspěšnou kultivaci embryí mimo ženské tělo. Klasická doba kultivace po oplodnění trvá okolo 48 hodin. V ART se ale velmi často používá prodloužená kultivace, kdy se embryo kultivuje do stádia blastocysty až po dobu 5-6 dní. K prodloužené kultivaci se nejčastěji používají sekvenční média, která svým složením dokáží reflektovat změny fyziologických požadavků embrya. Dále se využívá ko-kultivace společně s vrstvou buněk izolovaných z endometria, která má simulovat vývoj embrya *in vivo* (shrnutí v Jones et. al., 2002).

Na základě experimentů na zvířecích modelech se objevily spekulace, že MZ dvojčata mohou být indukovaná kultivačními podmínkami. Umělé kultivační podmínky, které mají simulovat prostředí vejcovodů a dělohy, by tak mohly předurčit embryo k rozdělení. Behr et al. (2000) se domnívali, že běžná kultivační média mohou způsobit nesprávnou adhezi mezi buňkami. Nižší koncentrace vápníku v rozšířeném kultivačním médiu by tak mohla destabilizovat intracelulární interakce v ICM a blastocysta by tak byla náchylnější k rozdělení (Steinman 2001, cit. dle Haimov-Kochman et al., 2009). Dále sekvenční média s vyšším obsahem glukózy na rozdíl od endometriální ko-kultivace mohou produkovat více volných radikálů, které indukují apoptózu a narušují ICM, neboť buňky uvnitř ICM se zdají být mnohem citlivější na oslabení než buňky trofoblastu (Menezo, 2002). Pokud embryo vystavíme kultivaci v sekvenčním médiu s vysokým obsahem glukózy, nemusí to nutně zapříčinit zvýšený výskyt MZ dvojčat. V případě přenosu embrya během druhého a až třetího dne kultivace je vychytávání volných radikálů velmi účinné. V případě prodloužené kultivace mohou ale tyto mechanismy selhávat a embryo vystavené suboptimálním podmínkám se může rozdělit (Cassuto et al., 2003). Podle další hypotézy je důležitější než samotné kultivační médium změna koncentrace glukózy mezi jednotlivými médii. Embrya to mohou vnímat jako stresovou situaci, která může vést až k jejich rozdělení (Moayeri et al., 2007).

5.1.3. Přenos embryí

Po úspěšné kultivaci embrya následuje jeho přenos do děložní sliznice. Přenos více embryí může vyřešit problém s nízkou mírou implantace během IVF. Zároveň ale zvyšuje míru vícečetných těhotenství. Jako řešení se nabízí výběr vysoce kvalitních embryí, čímž by se zajistila vyšší pravděpodobnost pro implantaci a současně by se kontroloval výskyt vícečetných těhotenství (Racowsky et al., 2000). Prodloužená kultivace lidského embrya do stádia blastocysty v sekvenčním médiu bez vyživovacích buněk a jejich přenos až pátý den po oplození vykazovala mnohem větší míru implantace a životaschopnosti než třídenní embrya v čtyřbuněčném až osmibuněčném stádiu (Gardner et al., 1998).

V roce 1999 byl popsán první případ vzniku MZ dvojčat po přenosu embryí ve stádiu blastocysty bez manipulace se ZP (Peramo et al., 1999). Poté následovaly další práce, které potvrzovaly vztah mezi přenosem blastocysty a vznikem MZ dvojčat. Behr et al. (2000) odhalili výskyt 5 % MZ těhotenství po přenosu blastocysty. Všechna MZ dvojčata byla monochorionická diamniotická. Da Costa et al. (2001) ve své práci zaznamenal MZ těhotenství po přenosu blastocyst s výskytem 3,9 %. Naopak ve sledovaném souboru se po přenosu čtyřbuněčného až osmibuněčného embrya MZ dvojčata vyskytovala pouze v 0,7 % případů. Populační studie Wright et al. (2004) odhalila, že v rozsáhlém vzorku 39 198 těhotenství počatých metodou IVF byl výskyt MZ dvojčat čtyřikrát vyšší při přenosu pětidenního embrya než při přenosu třídenního embrya. Je znepokojivé, že přenos pětidenního embrya vede k zvýšené míře těhotenství obsahující monochorionická dvojčata. Přenos blastocysty v kombinaci s intracytoplasmatickou injekcí spermií (ICSI) zvyšuje riziko monochorionické placentace dokonce až na dvacetinásobek (Skiadas et al., 2008). Nabízí se tedy myšlenka, že pokud po přenosu blastocysty dochází ke zvýšenému výskytu monochorionických diamniotických párů, o kterých víme, že jsou výsledkem pozdějšího rozdělení, mohla by stát za zvýšeným výskytem opožděná implantace.

Vliv přenosu blastocysty na zvýšenou míru MZ dvojčat však není jednoznačný. Franasiak et al. (2015) nezaznamenali rozdíl mezi přenosem embrya ve fázi rýhování a embrya ve fázi blastocysty. Ačkoliv autoři zcela nevyloučili vliv laboratorních technik používaných ke kultivaci a následnému oplodnění, větší důležitost přikládali kvalitě embryí a zdravotnímu stavu pacientky. Mladší pacientky s kvalitnějšími embryi tedy měly větší pravděpodobnost, že v rámci IVF podstoupí přenos blastocysty. Za vysvětlením vyšší míry MZ dvojčat v této situaci by mohla být vyšší citlivost embrya ve stádiu blastocysty na účinky mechanické manipulace v laboratoři nebo přechodné změny teploty nebo pH během monitorování (Luke et al., 2014).

5.1.4. Mikromanipulační techniky

První záznamy o případech MZ dvojčat, které nastaly po IVF cyklech, vedlo řadu autorů k myšlence, že existuje přímá souvislost mezi fyzickým stavem ZP a vznikem MZ dvojčat. ZP je glykoproteinový obal syntetizovaný a sekretovaný oocytem u savců. ZP váže spermie a spouští akrozomální reakci. Funguje také jako mechanická bariéra omezující prodloužení nebo fúzi dělicí se ICM. Chemické nebo mechanické porušení mukopolysacharidové architektury nebo abnormální syntéza mukopolysacharidů může přispívat ke vzniku MZ dvojčat (Alikani et al., 1994).

Mezi primární mikromanipulační techniky léčby neplodnosti v současnosti patří metoda ICSI, která je založena na injekci spermie s omezenou pohyblivostí pomocí mikrokapiláry do cytoplazmy zralého oocytu. Tento postup se provádí v případě nízkého počtu spermií, při jejich nízké pohyblivosti nebo u spermií získaných mikrochirurgicky z varlete nebo nadvarlete. Další mikromanipulační technikou je asistovaný hatching (AH), což je šetrný způsob narušení ZP pomocí laseru nebo speciální jehly před přenosem embrya. Vytvoření umělého otvoru usnadní embryu dostat se ze ZP a následně se úspěšně uhnízdít v děložní sliznici. Tato metoda se doporučuje pacientkám s vyšším věkem, zesílenou ZP, zvýšenou hodnotou FSH nebo po opakovaném selhání implantace (Žáková et al., 2010).

První studie naznačovaly, že manipulací se ZP lze procento těhotenství zvýšit o 40 % až 70 % (Slotnick a Ortega, 1996). Hershlag et al. (1999) popsali, že po AH dochází ke zvýšení procenta vícečetných těhotenství z 6,8 % na 13,1 % a zvýšení procenta MZ dvojčata z 0 % na 1,2 %. Vitthala et al., (2009) ve své rozsáhlé metaanalýze došli k závěru, že vyšší míra MZ dvojčat se objevuje u párů, které podstoupily přenos blastocysty nebo ICSI než u párů, kteří podstoupili konvenční IVF nebo AH. Nutno také zmínit, že manipulace se ZP pravděpodobně zvyšuje riziko pro časné rozdělení, tedy vznik dichorionických diamniotických MZ dvojčat (Knopman et al., 2014).

Lidská embrya se v rámci AH musí protáhnout uměle vytvořeným otvorem. Vytvoření příliš úzkého otvoru v ZP může vyvíjet tlak na expandující blastocystu. (Malter a Cohen, 1989). AH a ICSI se liší velikostí uměle vytvořeného otvoru v ZP. Zatímco otvor během ICSI činí v průměru pouze 7-8 μm , během AH je to v průměru 20-30 μm (Sills, 2000). Manipulace se ZP v rámci metod ICSI nebo AH by mohlo spustit vyhřeznutí blastomer skrz otvor v ZP během expanze blastocysty. Mechanické rozdělení embrya by zapříčinilo vznik MZ dvojčat (Talansky a Gordon, 1988).

Jak bylo zmíněno výše, AH podstupují převážně ženy v pokročilém věku, u nichž opakovaně selhala implantace nebo jejichž embrya mají nízkou kvalitu. Tudíž nelze přesně říct,

zda za zvýšeným rizikem stojí změny ZP nebo pacientčina prognóza (Alikani et al., 2003). Existují ale také i studie, které neprokázaly, že by manipulační techniky zvyšovaly výskyt MZ dvojčat (Schachter et al., 2001; Sills et. al., 2000). Velká retrospektivní analýza uváděná Sills et. al. (2000) označila vztah mezi AH a MZ jako vysoce spekulativní. Zvýšený výskyt MZ dvojčat během IVF autoři připisovali vyššímu počtu přenesených embryí než manipulaci se ZP. Také připomněli skutečnost, že rozdělení lidského blastocoelu při průchodu uměle vytvořeným otvorem nebylo nikdy přímo pozorováno.

Je zajímavé, že ačkoliv během další mikromanipulační techniky zvané preimplantační genetická diagnostika (PGD) dochází k biopsii a k porušení ZP laserem, nejedná se pravděpodobně o faktor mající vliv na MZ dvojčata. Metoda PGD se doporučuje párům, u kterých hrozí přenos závažné genetické vady na potomky a cílem je identifikace případných chromozomálních aberací. Nejprve jsou odebrány jedna až dvě blastomery z embrya v 8-10 buněčném stádiu, a poté následuje genetické vyšetření, které má vyloučit embrya s abnormalitami (Žáková et al., 2010). Verpoest et al., (2009) ve své retrospektivní kohortové studii nezaznamenali u pacientek podstupující PGD výrazný vzrůst MZ dvojčat a vyloučili tak, že by tato metoda zvyšovala jejich výskyt.

5.1.5. Věk matky

V literatuře se setkáváme s různými názory, zda věk matky ovlivňuje vznik MZ dvojčat. Při spontánním těhotenství se se zvyšujícím věkem matky zvyšuje i procento MZ dvojčat. Ta byla pozorována v 7 z 11 případů u žen starších 35 let (Abusheika et al., 2000). Vysvětlením bylo, že se zvyšujícím věkem ženy dochází k ztenčování ZP. Nabízí se, že blastocysta může vyčnívat skrz tato místa a to by mohlo být příčinou rozdělení ICM (Cohen et al., 1992).

Naopak v případě ART byl zvýšený výskyt zaznamenán u pacientek s věkem pod 35 let (Franasiak et al. 2015). Knopman et al. (2010) ve své práci nejprve srovnali IVF s vlastními oocyty od žen, které byly mladší než 35 let s IVF s oocyty od dárců, kteří byli též mladší než 35 let. Výsledkem byl téměř dvojnásobný nárůst MZ dvojčat po IVF s darovanými oocyty. Pozdější analýzy ale odhalily, že rizikový nebyl samotný proces darování oocytů, ale věk (<35 let) těchto dárek. S každým rokem zvýšení věku oocytu se tak může pravděpodobnost početí MZ dvojčat snížit o 4 % (Knopman et al., 2014). Jak bylo již zmíněno výše, mladší ženy s dobrou prognózou a kvalitními embryi mají větší pravděpodobnost, že v rámci léčby neplodnosti podstoupí přenos blastocysty. Nelze tedy přesně říct, zda zvýšený

výskyt u pacientky před 35. rokem života je dán skutečně inherentní kvalitou oocytů nebo laboratorními metodami používaných v rámci umělého oplodnění.

Řada studií ale nenašla žádný vztah mezi věkem matky a vznikem MZ dvojčat (Alikani et al., 2003; da Costa et al., 2001; Skiadas et al., 2008). Zdá se tedy, že věk matky má vliv na vznik MZ dvojčat, ale tento příspěvek není nijak zásadní.

5.2. Genetika

Přestože si mnoho lidí myslí, že MZ dvojčata jsou zcela identická, pravdou je, že se mohou genotypově i fenotypově lišit. Nesoulad mezi MZ dvojčaty může způsobit rozdílný karyotyp, X-inaktivace, imprinting a další genetické a epigenetické modifikace (shrnuto v Silva et al., 2011). Proto jsou vhodným modelem pro objasnění genetické predispozice stojící za řadou lidských onemocnění. Je zajímavé, že v případě MZ dvojčat převažuje ženské pohlaví. Nadbytek ženských embryí vzrůstá s pozdějším rozdělením embrya, nejvíce jich pak lze najít u spojených dvojčat (James, 1980). MZ dvojčata ženského pohlaví podléhají náhodné inaktivaci X chromozomu, která se projevuje odlišností v X-vázaných onemocněních jako je například svalová dystrofie (Richards et al., 1990). Další možným vysvětlením je, že rychlost růstu preimplanatačního ženského embrya je nižší než u mužského embrya (Pergament et al., 1994).

Zatímco DZ dvojčata jsou ovlivněna genetickou predispozicí, MZ dvojčata jsou pravděpodobně výsledkem náhodné události. Prevalence DZ dvojčat v rodině, ve které se v minulosti DZ dvojčata již vyskytla, byla mnohem vyšší než prevalence dalších MZ dvojčat v rodině s MZ dvojčaty (Lewis et al., 1996). Možná příčina častého výskytu MZ dvojčat v rodině se zdá být autozomálně dominantní dědičností se sníženou penetrací, která byla popsána vázána jak na mateřskou i otcovskou linii (Harvey et al., 1977), tak pouze s mateřskou linií bez otcovského účinku (Lichtenstein et al., 1998). Přestože je vzácné, aby se v jedné rodině opakovaně rodila MZ dvojčata, existují záznamy popisující rodiny s vysokým výskytem MZ dvojčat. Hamamy et al. (2004) uvedli třináct párů MZ dvojčat v rozvětvené jordánské rodině. V rodině docházelo ke sňatkům mezi příbuznými, autoři práce se ale nepřikláněli k názoru, že by příbuznost ovlivňovala míru vzniku MZ dvojčat. Studie věnující se rodinnému výskytu MZ dvojčat jsou často limitovány tím, že není možné získat úplnou rodinnou historii, a tudíž nelze přesvědčivě dokázat či vyvrátit genetický příspěvek.

Naopak Sobek et al. (2015) provedli průzkum mezi pacientkami, které podstoupily léčbu neplodnosti a následně se jim narodila MZ dvojčata. Rodinná historie dvojčat se prokázala

u 45 % žen. Navrhli, že embrya byla geneticky předurčena k rozdělení a ovariální stimulace pouze tento fakt umocnila.

S cílem probádat hlavní genetické faktory u MZ dvojčat provedli Liu et al. (2018) sekvenování celého genomu MZ ženských dvojčat čtyřgeneračního rodokmenu. Zkoumáním polymorfismů napříč X-chromozomem odhalili pět nových genetických variant specifických pro MZ dvojčata, ale pouze jedna byla umístěna v oblasti exonu, konkrétně v oblasti, která kóduje downstream efektor signalizace kostní morfogenetické bílkoviny. Na autozomech MZ dvojčat této rodiny objevili jednonukleotidové polymorfismy v genech souvisejících se signálními dráhami regulující buněčné spojení. Pozornost na polymorfismy E-kadherinu v DNA extrahované z placentální tkáně byla obrácena již dříve. Neprokázalo se ale, že by snížená exprese E-kadherinu patřila mezi hlavní příčiny ovlivňující familiární nebo spontánní výskyt MZ dvojčat. Autoři této studie ovšem nevyloučili, že by mohla přispívat k jiným genetickým a enviromentálním faktorům (Bamforth et al., 2003).

6. Další možné mechanismy vzniku monozygotických dvojčat

Mechanismus rozdělení MZ dvojčat zůstává stále otevřenou otázkou. Mezi navržené hypotézy patří vyhřeznutí blastocysty skrz otvor v ZP nebo oslabení intracelulárních vazeb snížením hladiny vápníku, které již byly zmíněny výše. Tato kapitola uvádí další hypotézy, které literatura nabízí, přestože ani jedna neposkytuje přímé vysvětlení tohoto jevu.

6.1. Hypotéza o existenci kodominantní osy

V embryonálním vývoji existuje mnoho potencionální bodů, ze kterých by mohla vzniknout embryonální osa. Vznik embryonální osy v tomto jednom bodě potlačuje potenciální schopnost ostatních bodů tvořit další embryonální osy. Tato teorie navrhuje, že existuje malý neobvyklý shluk buněk, který nějakým blíže nespecifikovaným mechanismem může zapříčinit, že se místo jednoho organizačního centra tvoří organizační centra dvě. Potenciál pro vznik MZ dvojčat může být pravděpodobně přítomen ve všech oocytech a jeho spouštěčem by mohly být neobvyklé podmínky jako například opožděná implantace. Zpoždění ve vývoji dominantní osy by mohlo umožnit vývoj kodominantní osy (Baldwin, 1994).

6.2. Hypotéza o odpuzování buněk

MZ dvojčata mají mezi sebou jemné genetické nesrovnalosti (například rozdílná X- inaktivace, genová regulace, mutace v genech..). Vývoj takové nesouhlasné buněčné linie může vést tomu, že se buňky začnou navzájem rozpoznávat jako cizí. Vzniká tedy jakási odpuzivá síla, která vede až k rozdělení buněčné hmoty (Hall, 1996).

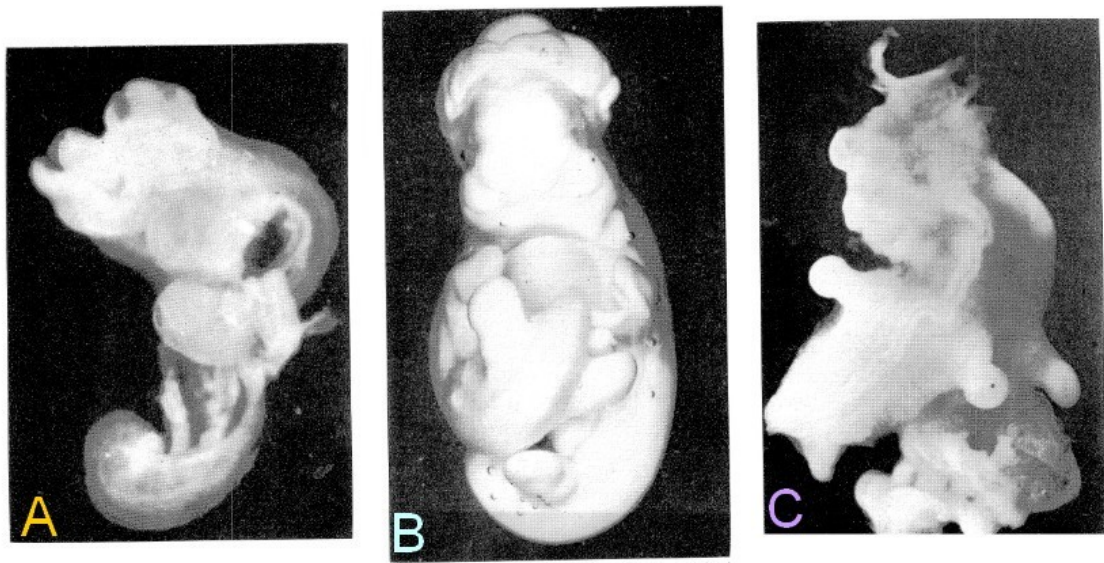
7. Experimentální indukce monozygotických dvojčat u savců

V savčím vývoji jsou MZ dvojčata relativně vzácnou událostí. Jak už bylo řečeno, pravidelný přirozený výskyt MZ dvojčat nacházíme jen u dvou druhů pásovců. Existují ale záznamy o sporadickém přirozeném výskytu MZ dvojčat například u koní (Govaere et al., 2009), skotu (Silva del Río et al., 2006), šimpanzů (Ely et al., 2006) nebo dokonce u velryb (Kimura, 1957). Následující kapitola má čtenáři nastínit jak lze experimentální cestou dosáhnout vzniku MZ dvojčat. MZ dvojčata mají totiž významnou hodnotu v řadě biologických výzkumů, které vyžadují přístup ke geneticky shodným jedincům. Příkladem mohou být třeba některé druhy primátů, které jsou důležitým modelem pro řadu lidských onemocnění. Dovoz z volné přírody je ovšem v mnoha zemích pozastavený a selektivní šlechtění je příliš zdlouhavé.

7.1. Teratogenní látky

Teratogenní činidla jsou látky, které narušují přirozený embryonální vývoj savců a způsobují rozdělení embrya. Mezi takové látky patří i alkaloidy vinkristin a vinblastin, které inhibují polymeraci mikrotubulů a hrají důležitou roli v protinádorové léčbě. Kaufman a O'Shea (1978) se podařilo dávkou 0,3 mg vinkristin sulfátu na kg živé váhy vyvolat rozdělení myších embryí. Dávka byla březím samicím podána vždy ráno během šestého, sedmého a osmého dne březosti. Autoři uváděli, že nejlepších výsledků indukce MZ dvojčat bylo dosaženo po dávce podané sedmý den březosti. Je nutné zmínit, že v jiné studii, která experiment s vinkristin sulfátem zopakovala, vliv na indukci MZ nebyl pozorován (Wan et al., 1982). Proces vzniku MZ dvojčat byl také vyvolán vinblastin sulfátem. Myši blastocysty byly vyjmuty z dělohy třetí den březosti a po odstranění ZP vystaveny $5 \cdot 10^{-9}$ mg/ml vinblastin sulfátu. Z celkového počtu 429 blastocyst došlo k rozdělení ICM na dvě části u 15 blastocyst. Blastocysty, jejichž ICM se rozdělilo na více než dvě část, ale nebyly životaschopné (Naruse et al., 1983). Účinek třech teratogenních látek byl také pozorován u křečka zlatého, někdy též

nazývaného jako křeček syrský (*Mesocricetus auratus*). Samicím byla osmý den těhotenství podána buď dávka 25 mg urethanu perorální aplikací, nebo 20 000 jednotek vitamínu A žaludeční sondou, nebo 1 250 mg/kg dimethylsulfoxidu nitrožilní aplikací. Všechna těhotenství byla předčasně ukončena a embrya poté byla vyfotografována (viz obrázek 3). Výsledkem experimentu byla spojená dvojčata (Ferm, 1969). Ačkoliv byla MZ dvojčata pozorována po použití teratogenních látek, riziko vzniku vrozených vad je příliš vysoké a nejsou tedy vhodné pro indukci MZ dvojčat.



Obrázek 3: A- devítidenní embryo křečka zlatého po 24 h po dávce vitamínu A (21 x zvětšeno), B- jedenáctidenní embryo křečka zlatého po 72 h po dávce urethanu (8 x zvětšeno), C- jedenáctidenní embryo křečka zlatého po 72 h po dávce dimethyl sulfoxidu (6 x zvětšeno) (převzato a upraveno z Ferm, 1969).

7.2. Separace blastomer a bisekce moruly/blastocysty

K produkci MZ dvojčat se běžně používá buď rozdělení moruly/blastocysty chirurgickým řezem nebo separace blastomer u embryí ve dvou až osmibuněčném stadiu. Metoda bisekce moruly/blastocysty se provádí skleněnou jehlou nebo skleněnou či kovovou čepelí a výsledkem jsou dvě poloviční embrya přibližně stejných velikostí. Separace blastomer se provádí buď mechanicky pomocí mikromanipulátoru nebo chemicky. Oba postupy lze také kombinovat. Při chemickém postupu dochází nejprve k odstranění ZP působením kyselého Tyrodova roztoku nebo pronázy, samostatné blastomery jsou separovány pomocí enzymu trypsinu. (shrnutí v Casser et al., 2019)

První umělá produkce MZ dvojčat ovčí separací blastomer dvoubuněčného stádia se podařila Willadsenovi (1979). Nejprve jednotlivé separované blastomery se ZP přenesl v agarózovém gelu do vejcovodu bahnic. Agarózový gel sloužil k ošetření řezů v ZP a také jako ochrana před sekrety děložní sliznice. Za 3,5 – 4,5 dne embrya vyjmul a selektoval. V následujícím kroku embrya ve stádiu pozdní moruly nebo časně blastocysty již bez agarózového gelu přenesl do reprodukčního aparátu konečných příjemkyň. Willadsen spolu s Godke následně naznačili, že technika bisekce embrya ve stádiu moruly až blastocysty je jednodušší na provedení než separace blastomer a zároveň bisekce blastocysty stojí za mnohem vyšším procentem přenesených embryí (Willadsen a Godke 1984, cit. dle Casser et al., 2019). Tyto objevy se staly základem pro embryonální klonování, a tedy i umělou produkci MZ dvojčat.

Pár MZ dvojčat byl také postupem, který navrhl Willadsen pro separaci blastomerů, produkován u koní (Allen a Pashen, 1984), a to navzdory skutečnosti, že placenta klisen není přizpůsobena vícečetnému těhotenství a klisna během březosti často potratí nebo se jedno či obě mláďata narodí mrtvá (Jeffcott a Whitwell, 1973). Separace blastomer dala vznik MZ dvojčatům ještě u koz (Tsunoda et. al, 1985) nebo myší (Papaioannou et al., 1989).

Yang a Foote (1987) provedli výzkum za účelem zlepšení postupů při mikromanipulaci s králíčími embryi. Přestože hlavní překážkou pro práci s králíčími embryi je mucinová vrstva, kterou najdeme okolo ZP (Greenwald, 1962), podařilo se jim z jedenácti mláďat, která se vyvinula z embryí vzniklých po biosekcí, produkovat dva páry MZ dvojčaty. Jako nejlepší stádium embrya pro provedení bisekce uvedli pozdní morulu nebo časnou blastocystu. Bisekcí embrya vznikla MZ dvojčata třeba u myší (Nagashima et al., 1984) nebo vepře (Nagashima et al., 1989).

8. Závěr

MZ dvojčata jsou výsledkem rozdělení embrya v časně embryogenezi. Vývojové stádium, ve kterém nastane rozdělení, je klíčovým faktorem určující amnionicitu a chorionicitu. Dichorionická diamniotická dvojčata vznikají rozdělením embrya během rýhování a to do 4. dnů po oplodnění. Nejčastějším typem jsou monochorionická diamniotická dvojčata, která vznikají rozdělením blastocysty během 4.-8. dnů po oplodnění. Rozdělením již uhnížděné blastocysty během 8.-12. dne vznikají monochorionická monoamniotická dvojčata., u kterých hrozí zvýšená pravděpodobnost výskytu komplikací jako je twin-to-twin transfúzní syndrom, zapletení pupečních šňůr, předčasný porod nebo další vrozené malformace. Pokud rozdělení nenastane do 13. dní po oplození, vznikají spojená dvojčata, která jsou ventrálně nebo dorsálně spojená.

Navzdory pokrokům ve vývojové biologii během několika posledních desetiletí, není stále jasné, co rozdělení embrya způsobuje. Mezi možné mechanismy vysvětlující rozdělení ICM a tedy vznik MZ dvojčat patří vyhřeznutí blastomery skrz otvor v ZP, oslabení intracelulárních vazeb, buněčné odpuzování nebo existence kodominantní osy. Jedná se ale o hypotézy, které nenabízí plné vysvětlení.

ART vede k nárůstu vícečetných těhotenstvích. Po léčbě neplodnosti bylo zaznamenáno zvýšení MZ těhotenství z 0,45 % až na 5 %. Protože vícečetná těhotenství jsou rizikem jak pro plod, tak pro matku, je důležité se jim snažit předcházet.

Možná příčina častého výskytu MZ dvojčat v rodině se zdá být autozomálně dominantní dědičnost se sníženou penetrací. Jedna teorie dokonce navrhuje, že existuje subpopulace oocytů, která má vrozený sklon podstoupit rozdělení. Ovariální stimulace při léčbě neplodnosti pouze zvýší pravděpodobnost, že tyto oocyty budou dostupné. Ovariální stimulace také pravděpodobně mění mechanické vlastnosti ZP a tím dochází k jejímu nerovnoměrnému zpevnění. Vznikají místa, kterými se blastocysta snaží uniknout a dochází tak k jejímu rozdělení.

Vyhřeznutí blastocysty mohou způsobovat i mikromanipulační techniky, jako je ICSI a AH, během kterých vznikají v ZP umělé otvory. Vytvoření příliš úzkého otvoru může vyvíjet tlak na expandující blastocystu a rozdělit ji.

Suboptimální kultivační podmínky by také mohly vést k rozdělení embryí. Nižší koncentrace vápníku v rozšířeném kultivačním médiu by mohly destabilizovat intracelulární interakce v embryoblastu. Rizikové se zdá také použití sekvenčních médií s vyšším obsahem glukózy, které mohou produkovat více volných radikálů, které indukují apoptózu a narušují vnitřní ICM, neboť ICM se zdají být mnohem citlivější na oslabení než buňky trofoblastu.

Sekvenční média se používají převážně u prodloužené kultivace embryí do stádia blastocysty. I zde byl pozorován zvýšený výskyt MZ dvojčat.

Při spontánním těhotenství se zvyšujícím věkem matky zvyšuje i procento MZ dvojčat. Naopak v případě ART byl zvýšený výskyt zaznamenán u pacientek s věkem pod 35 let. Zdá se tedy, že věk matky má vliv na vznik MZ dvojčat, ale tento příspěvek není nijak zásadní.

MZ dvojčata se v současnosti nejčastěji u savců produkují separací blastomer nebo bisekcí embrya. MZ dvojčata mají významnou hodnotu v řadě biologických výzkumů, které vyžadují přístup ke geneticky shodným jedincům.

9. Použitá literatura

- Abusheika, N., Salha, O., Sharma, V., and Brinsden, P. (2000). Monozygotic twinning and IVF / ICSI treatment : a report of 11 cases and review of literature. *Hum. Reprod. Update* 6, 396–403.
- Alikani, M., Noyes, N., Cohen, J., and Rosenwaks, Z. (1994). Fertilization and early embryology: Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture. *Hum. Reprod.* 9, 1318–1321.
- Alikani, M., Cekleniak, N.A., Walters, E., and Cohen, J. (2003). Monozygotic twinning following assisted conception: An analysis of 81 consecutive cases. *Hum. Reprod.* 18, 1937–1943.
- Allen, W.R., and Pashen, R.L. (1984). Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J. Reprod. Fert.* 71, 607-613
- Van der Auwera, I. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum. Reprod.* 16, 1237–1243.
- Baldwin, V. J. (1994). Pathology of multiple pregnancy. New York, NY: Springer Verlag. 16-17.
- Bamforth, F., Brown, L., Senz, J., and Huntsman, D. (2003). Mechanisms of monozygotic (MZ) twinning: A possible role for the cell adhesion molecule, E-cadherin. *Am. J. Med. Genet.* 120A, 59–62.
- Behr, B., Fisch, J.D., Racowsky, C., Miller, K., Pool, T.B., and Milki, A.A. (2000). Blastocyst-ET and monozygotic twinning. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17, 349–351.
- Blickstein, I. (2005). Estimation of iatrogenic monozygotic twinning rate following assisted reproduction: Pitfalls and caveats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 365–368.
- Blickstein, I., Keith L. G. (2007). On the Possible Cause of Monozygotic Twinning: Lessons From the 9-Banded Armadillo and From Assisted Reproduction. *Twin Research and Human Genetics* 10, 394-399.
- Carlson B. M. (2014). Human embryology and development biology. Elsevier Health Sciences. 117-135
- *Carter, A.M. (2018). Classics revisited: Miguel Fernández on germ layer inversion and specific polyembryony in armadillos. *Placenta* 61, 55–60.
- *Casser, E., Israel, S., and Boiani, M. (2019). Multiplying embryos: Experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *Int. J. Dev. Biol.* 63, 143–155.
- Cassuto, G., Chavier, M., and Menezo, Y. (2003). Culture conditions and not prolonged culture time are responsible for monozygotic twinning in human in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 80, 462–463.
- Cohen, J., Alikani, M., Trowbridge, J., and Rosenwaks, Z. (1992). Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum. Reprod.* 7, 685–691.
- Cordero, L., Franco, A., and Joy, S.D. (2006). Monochorionic monoamniotic twins: Neonatal outcome. *J. Perinatol.* 26, 170–175.
- Corner, G.W. (1922). The morphological theory of monochorionic twins as illustrated by a series of supposed early twin embryos of the pig. *Johns Hopkins Hosp. Bull.* 33, 389–92.
- Corner, G.W. (1955). The observed embryology of human single-ovum twins and other multiple births. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 70, 933–951.
- da Costa, A.L.E., Abdelmassih S., de Oliveira F. G., Abdelmassih V., Abdelmassih R., Nagy Z. P., Balmaceda J. P. (2001). Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum. Reprod.* 16, 333–336.

- Coulton, D., Hertig, A.T., and Long, W.N. (1947). Monoamniotic twins. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 54, 119–123.
- Denker, HW. (2013). Comment on G. Herranz: The timing of monozygotic twinning: a criticism of the common model. *Zygote* (2013). *Zygote* 23, 312–314.
- Derom, C., Derom, R., Vlietinck, R., Berghe, H. Vanden, and Thiery, M. (1987). Increased Monozygotic Twinning Rate After Ovulation Induction. *Lancet* 329, 1236–1238.
- Derom, C., Leroy, F., Vlietinck, R., Fryns, J.P., and Derom, R. (2006). High frequency of iatrogenic monozygotic twins with administration of clomiphene citrate and a change in chorionicity. *Fertil. Steril.* 85, 755–757.
- Ely, J.J., Frels, W.I., Howell, S., Izard, M.K., Keeling, M.E., and Lee, D.R. (2006). Twinning and heteropaternality in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am. J. Phys. Anthropol.* 130, 96–102.
- Enders, A.C. (2002a). Implantation in the nine-banded armadillo: How does a single blastocyst form four embryos? *Placenta* 23, 71–85.
- Enders, A.C. (2002b). Formation of monozygotic twins: When does it occur? *Placenta* 23, 236–238.
- Fathalla, M.F. (2003). Current challenges in assisted reproduction. *Middle East Fertil. Soc. J.* 8, 117–121.
- Ferm, V.H. (1969). Conjoined Twinning in Mammalian Teratology. *Arch. Environ. Health* 19, 353–357.
- Fernández M. (1909). Beiträge zur Embryologie der Gürteltiere. 1. Zur Keimblätter- inversion und spezifischen Polyembryonie der Mulita (*Tatusia hybrida* Desm.). *Morphol. Jahrb.* 39, 302–333.
- Franasiak, J.M., Dondik, Y., Molinaro, T.A., Hong, K.H., Forman, E.J., Werner, M.D., Upham, K.M., and Scott, R.T. (2015). Blastocyst transfer is not associated with increased rates of monozygotic twins when controlling for embryo cohort quality. *Fertil. Steril.* 103, 95–100.
- Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J., and Hesla, J. (1998). A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 13, 3434–3440.
- Govaere, J., Hoogewijs, M., De Schauwer, C., Van Zeveren, A., Smits, K., Cornillie, P., and De Kruif, A. (2009). An abortion of monozygotic twins in a warmblood mare. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 852–854.
- Greenwald, G.S. (1962). The role of the mucin layer in development of the rabbit blastocyst. *Anat. Rec.* 142, 407–415.
- *Haimov-Kochman, R., Daum, H., Lossos, F., Aizenman, E., Werner, M., Yagel, S., Laufer, N., Simon, A., and Hurwitz, A. (2009). Monozygotic multiple gestation after intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* 92, 2037.e11–2037.e17.
- Hall, J.G. (1996). Twins and twinning. *Am. J. Med. Genet.* 61, 202–204.
- Hamamy, H.A., Ajlouni, H.K., and Ajlouni, K.M. (2004). Familial monozygotic twinning: Report of an extended multi-generation family. *Twin Res.* 7, 219–222.
- Hamlett, G.W.D. (1935). Delayed Implantation and Discontinuous Development in the Mammals. *The Quarterly Review of Biology* 10, 432–447.
- Harvey, M.A.S., Huntley, R.M.C., and Smith, D.W. (1977). Familial monozygotic twinning. *J. Pediatr.* 90, 246–248.
- *Herranz, G. (2013). The timing of monozygotic twinning: A criticism of the common model. *Zygote* 23, 27–40.

- Hershlag, A., Paine, T., Cooper, G.W., Scholl, G.M., Rawlinson, K., and Kvapil, G. (1999). Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil. Steril.* 71, 144–146.
- Hertig, A.T. (1945). On the development of the amnion and exocoelomic membrane in the previllous human ovum. *Yale J. Biol. Med.* 18, 107–115.
- *Hugues, JN. (2002). Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In: Vayena E., Rowe P. J., Griffin P. D. (2002). Current practices and controversies in assisted reproduction. 1.vyd. Geneva: *World Health Organization*, 102-125, ISBN: 92 4 159030 0.
- James, W.H. (1980). Sex ratio and placentation in twins. *Ann. Hum. Biol.* 7, 273–276.
- Jeffcott L. B., Whitwell K. E. (1973). Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in the thoroughbred mare. *J. Comp. Path.* 83. 91-96.
- *Jones. G. M., Figueiredo F., Osianlis T., Pope A. K., Rombauts L., Steeves T. E., Thouast G., Trounson A. O. (2002). Embryo culture, assessment, selection and transfer. In: Vayena E., Rowe P. J., Griffin P. D. (2002). Current practices and controversies in assisted reproduction. 1.vyd. Geneva: *World Health Organization*, 179-209, ISBN: 92 4 159030 0.
- Källén, B., Olausson, P.O., and Nygren, K.G. (2002). Neonatal outcome in pregnancies from ovarian stimulation. *Obstet. Gynecol.* 100, 414–419.
- Kaufman, M.H. (2004). The embryology of conjoined twins. *Child's Nerv. Syst.* 20, 508–525.
- Kaufman, M.H., and O'Shea, K.S. (1978). Induction of monozygotic twinning in the mouse. *Nature* 276, 707–708.
- Kimura, S. (1957). The twinning in southern fin whales. *Sci. Rpts. Whales Res. Inst.* 12, 103–125.
- Knopman, J., Krey, L.C., Ph, D., Lee, J., Fino, M.E., Novetsky, A.P., and Noyes, N. (2010). Monozygotic twinning : an eight-year experience at a large IVF center. *Fertil. Steril.* 94, 502–510.
- Knopman, J.M., Krey, L.C., Oh, C., Lee, J., McCaffrey, C., and Noyes, N. (2014). What makes them split? Identifying risk factors that lead to monozygotic twins after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 102, 82–89.
- Lewis, C.M., Healey, S.C., and Martin, N.G. (1996). Genetic contribution to DZ twinning. *Am. J. Med. Genet.* 61, 237–246.
- Lichtenstein, P., Källén, B., and Köster, M. (1998). No paternal effect on monozygotic twinning in the Swedish Twin Registry. *Twin Res.* 1, 212–215.
- Liu, S., Hong, Y., Cui, K., Guan, J., Han, L., Chen, W., Xu, Z., Gong, K., Ou, Y., Zeng, C., et al. (2018). Four-generation pedigree of monozygotic female twins reveals genetic factors in twinning process by whole-genome sequencing. *Twin Res. Hum. Genet.* 21, 361–368.
- Livingston, J.E., and Poland, B.J. (1980). A study of spontaneously aborted twins. *Teratology* 21, 139–148.
- Longo, F.J. (1981). Changes in the Zonae Pellucidae and Plasmalemmae of Aging Mouse Eggs. *Biol. Reprod.* 25, 399–411.
- Luke, B., Brown, M.B., Wantman, E., and Stern, J.E. (2014). Factors associated with monozygosity in assisted reproductive technology pregnancies and the risk of recurrence using linked cycles. *Fertil. Steril.* 101, 683–689.
- Malter, H.E., and Cohen, J. (1989). Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res.* 24, 67–80.
- Menezo, Y.J.R. (2002). Monozygotic twinning: is it related to apoptosis in the embryo? *Hum. Reprod.* 17, 247–248.

- Moayeri, S.E., Behr, B., Lathi, R.B., Westphal, L.M., and Milki, A.A. (2007). Risk of monozygotic twinning with blastocyst transfer decreases over time: an 8-year experience. *Fertil. Steril.* 87, 1028–1032.
- Mutchinick, O.M., Luna-Muñoz, L., Amar, E., Bakker, M.K., Clementi, M., Cocchi, G., da Graça Dutra, M., Feldkamp, M.L., Landau, D. and Leoncini, E., et al. (2011). Conjoined twins: A worldwide collaborative epidemiological study of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 157, 274–287.
- Nagashima, H., Matsui K., Sawasaki T. and Kano, Y. (1984). Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.* 70, 357-362.
- Nagashima, H., Kato, Y., and Ogawa, S. (1989). Microsurgical bisection of porcine morulae and blastocysts to produce monozygotic twin pregnancy. *Gamete Res.* 23, 1–9.
- Naruse, I., Kano, S., and Shoji, R. (1983). Experimental induction of two inner cell masses in mouse embryos by vinblastine treatment in vitro. *Teratology* 28, 215–218.
- Newman, H.H., and Patterson, J.T. (1909). a Case of Normal Identical Quadruplets in the Nine-Banded Armadillo, and Its Bearing on the Problems of Identical Twins and of Sex Determination. *Biol. Bull.* 17, 181–187.
- Papaioannou, V.E., Mkandawire, J., and Biggers, J.D. (1989). Development and phenotypic variability of genetically indentical half mouse embryos. *Development* 106, 817–827.
- Peramo, B., Ricciarelli, E., Cuadros-Fernández, J.M., Huguet, E., and Hernández, E.R. (1999). Blastocyst transfer and monozygotic twinning. *Fertil. Steril.* 72, 1116–1117.
- Pergament, E., Fiddler, M., Cho, N., Johnson, D., and Holmgren, W.J. (1994). Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum. Reprod.* 9, 1730–1732.
- Racowsky, C., Jackson, K. V., Cekleniak, N.A., Fox, J.H., Hornstein, M.D., and Ginsburg, E.S. (2000). The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil. Steril.* 73, 558–564.
- Richards, C.S., Watkins, S.C., Hoffman, E.P., Schneider, N.R., Milsark, I.W., Katz, K.S., Cook, J.D., Kunkel, L.M., and Cortada, J.M. (1990). Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 672–681.
- Schachter, M. (2001). Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation. *Hum. Reprod.* 16, 1264–1269.
- Sills, E.S. (2000). Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF. *Hum. Reprod.* 15, 890–895.
- *Silva, S., Martins, Y., Matias, A., and Blickstein, I. (2011). Why are monozygotic twins different? *J. Perinat. Med.* 39, 195–202.
- Silva del Río, N., Kirkpatrick, B.W., and Fricke, P.M. (2006). Observed frequency of monozygotic twinning in Holstein dairy cattle. *Theriogenology* 66, 1292–1299.
- Skiadas, C.C., Missmer, S.A., Benson, C.B., Gee, R.E., and Racowsky, C. (2008). Risk factors associated with pregnancies containing a monochorionic pair following assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.* 23, 1366–1371.
- Slotnick, R.N., and Ortega, J.E. (1996). Monoamniotic twinning and zona manipulation: A survey of U.S. IVF centers correlating zona manipulation procedures and high-risk twinning frequency. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13, 381–385.

- Sobek, A., Zbořilová, B., Procházka, M., Šilhánová, E., Koutná, O., Klásková, E., Tkadlec, E., and Sobak, A. (2015). High incidence of monozygotic twinning after assisted reproduction is related to genetic information, but not to assisted reproduction technology itself. *Fertil. Steril.* 103, 756–760.
- Sobek, A., Procházka, M., Klásková, E., Lubusky, M., and Pilka, R. (2016). High incidence of monozygotic twinning in infertility treatment. *Biomed. Pap.* 160, 358–362.
- Spencer, R. (1992). Conjoined twins: Theoretical embryologic basis. *Teratology* 45, 591–602.
- Spencer, R. (2000). Theoretical and analytical embryology of conjoined twins: Part I: Embryogenesis *Clin. Anat.* 13, 36-53.
- Steinman G, Valderrama E. (2001). Mechanisms of twinning. III. Placentation, calcium reduction and modified compaction. *Reprod. Med.* 46. 995–1002.
- Talansky, B.E., and Gordon, J.W. (1988). Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated and cultured after zona pellucida drilling. *Gamete Res.* 21, 277–287.
- Tong S., Caddy R., Short R. V. (1997). Use of dizygotic to monozygotic twinning ratio as a measure of fertility. *Lancet* 349. 843-845.
- Tsunoda Y., Tokunaga T., Sugie T., Katsumata M. (1985). Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos and goats. *Theriogenology* 24, 337-343.
- Verpoest, W., Van Landuyt, L., Desmyttere, S., Cremers, A., Devroey, P., and Liebaers, I. (2009). The incidence of monozygotic twinning following PGD is not increased. *Hum. Reprod.* 24, 2945–2950.
- Verschuer, O. v (1932). Die biologischen Grundlagen der menschlichen Mehrlingsforschung. *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl.* 61, 147–207.
- Vitthala, S., Gelbaya, T.A., Brison, D.R., Fitzgerald, C.T., and Nardo, L.G. (2009). The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 15, 45–55.
- Wan, YJ., Wu, TC., and Damjanov, I. (1982). Twinning and conjoined placentation in mice. *J. Exp. Zool.* 221, 81–86.
- Willadsen, S.M. (1979). A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277, 298–300.
- Willadsen, S.M. and Godke, R.A. (1984). A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.* 114. 240-243.
- Wright, V., Schieve, L.A., Vahratian, A. and Reynolds, M.A. (2004). Monozygotic twinning associated with day 5 embryo transfer in pregnancies conceived after IVF. *Hum. Reprod.* 19, 1831–1836.
- Yang, X., and Foote, R.H. (1987). Production of Identical Twin Rabbits by Micromanipulation of Embryos. *Biol. Reprod.* 37, 1007–1014.
- Yovich, J.L., Stanger, J.D., Grauaug, A., Barter, R.A., Lunay, G., Dawkins, R.L., and Mulcahy, M.T. (1984). Monozygotic twins from in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 41, 833–837.
- Žáková J, Huser M., Crha I., Ventruba P (2010). Embryologické metody asistované reprodukce. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity [online], [cit. 05.06.2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.med.muni.cz/clanek-518-embryologicke-metody-asistovane-reprodukce.html>. ISSN 1801-6103.

*hvědičkou je označena sekundární citace