Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Robert Středa **2013**

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Gynekologie a porodnictví

Minimalizace komplikací indukce ovulace gonadotropiny

The effort to minimize risks of ovulation induction with gonadotropins

MUDr. Robert Středa

Školitel: Doc. MUDr. Jindřich Tošner, CSc.

Hradec Králové, 4.2.2013 Obhajoba dne:

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 4.2.2013

Poděkování

Na prvním místě bych chtěl poděkovat své rodině, manželce Ilče a dětem Kryštofovi a Sofince. Ilče především za trpělivost a porozumění v průběhu odborné přípravy a při přípravě disertační práce. Dětem za inspiraci přirozenosti v průběhu jejich her a koníčků.

Srdečně bych chtěl poděkovat mému školiteli panu docentu MUDr. Jindřichu Tošnerovi, za odborné rady při tvorbě disertační práce a vlídný přístup při překonání dílčích problémů.

Chtěl bych také poděkovat MUDr.Tonku Mardešičovi a MUDr.Vladimíru Sobotkovi, za podmínky ke studiu a zázemí pro vznik práce.

V Hradci Králové, 4.2.2013 Robert Středa

Obsah

Poděkování....4
Použité zkratky....7
Úvod do problematiky....9
Epidemiologie neplodnosti....9
Příčiny neplodnosti....9
Počty cyklů léčby neplodnosti....11
Současný stav indukce ovulace gonadotropiny....13
Konvenční dávka 75- 150 IU - konvenční step-up protokol....14
Dávka 50 IU gonadotropinů denně- low dose step-up protokol....14
Mono-folikulární vývoj- cíl indukce ovulace....15
Individualizace léčby....16
Polymorfismus FSH receptoru....17
Tradiční pojetí folikulogeneze....19
Primordiální folikul....20
Primární folikul....20
Sekundární folikul....20
Terciální (dominantní, Graafův) folikul....20
Stádium preantrální....20
Stádium antrální....21
Ovulace....23
Hormonální mechanismy folikulogeneze....24
Gonadotropin uvolňující hormon (GnRH)....24
Folikulostimulační hormon (FSH)....25
Luteinizační hormon (LH)....27
Estradiol....27
Progesteron....28
Aktivin....28
Inhibin A a B....29
Model transgenních myší....30
Molekulární (signálové) mechanismy folikulogeneze....31
Primární folikul....31
Anti-Müllerianský hormon (AMH)....32
Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)....33
Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15)....33
Sekundární folikul....34
Insulin like growth factor 1 a 2 (IGF-1 a 2)....35
Aktivin A a B....35
Konečné zrání Graafova folikulu....36
Indukce ovulace....37
„FSH threshold“....37
„FSH window“....37
Klomifencitrát....38

Gonadotropiny 40
Určení adekvátní dávky gonadotropinů 41
Ovariální rezerva 42
Choriový gonadotropin pro konečnou maturaci oocytů 50
Intrauterinní inseminace 51
Faktory, které ovlivňují úspěšnost intrauterinní inseminace 53
Věk ženy 53
Faktor neplodnosti 54
Koncentrace spermií 54
Výběr protokolu mezi nativním cyklem, indukcí ovulace klomifencitrátem nebo gonadotropiny 54
Počet folikulů 54
Intracervikální versus intrauterinní inseminace 54
Podpora luteální fáze 55
Počet cyklů intrauterinní inseminace 57
Komplikace indukce ovulace s intrauterinní inseminací 61
Reakce na zavedení spermií po swim-up 61
Mimoděložní těhotenství 61
Vícečetné těhotenství 62
Ovariální hyperstimulační syndrom 64
Ovariální absces 67
Hypotéza ověřovaná ve studii 68
Předmět studie 68
Cíle disertační práce 69
Soubor nemocných, statistická analýza 70
Vlastní výsledky 72
Diskuze 79
Počet folikulů v jednotlivých skupinách 79
Mono-folikulární odpověď 79
Výška sliznice v době aplikace lidského choriového gonadotropinu 80
Celková spotřeba gonadotropinů na cyklus 80
Délku trvání léčebného cyklu 80
Pravděpodobnost dosažení klinického těhotenství 80
Riziko potratu 81
Riziko zrušení cyklů pro nízkou ovariální odpověď 81
Riziko zrušení cyklů pro nadměrnou ovariální odpověď 82
Riziko vícečetného těhotenství 82
Riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu 84
Závěry 86
Literatura 87
Přílohy 99
Seznam tabulek 99
Seznam grafů 100
Seznam obrázků 101

Použité zkratky

AC	adenylcykláza
AFC	poče antrálních folikulů (antral follicle count)
Ala	Alanin
AMH	anti-Müllerianský hormon (anti- Müllerian hormone)
Asp	Asparagin
BMI	body mass index
BMP	bone morphogenetic protein
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CC	klomifencitrát (clomiphen citrate)
CCCT	clomifencitrate chalenge test
DAG	diacylglycerol
EFORT	exogenous FSH ovarian reserve test
E2	estradiol, 17β-estradiol
FSH	folikulostimulační hormon
GAST	gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test
GDF-9	growth differentiation factor-9
GnRH	gonadotropin uvoňující hormon (gonadotropin releasing hormone)
GREM1	gremlin 1
hCG	human chorionic gonadotropin
ICSI	intracytoplasmatická injekce spermie do vajíčka (intracytoplasmic sperm injection)
IGF-1	inzulin like growth factor 1
IL-2	interleukin IL-2
IP_3	1,4,5- trifosfát
LH	luteinizační hormon
LHCGR	gen LH receptoru
OHSS	ovariální hyperstimulační syndrom (ovarian hyperstimulation syndrome)
PCOS	syndrom polycystických vaječníků (polycystic ovary syndrom)
PIP_2	fosfatidylinositol fosfát
PKC	protein kináza C
PLC-β	fosfolipáza Cβ

Ser	Serin
SERM	selective estrogen receptor modulator
TGF-β	transforming growth factor β
TNF-alfa	tumor necrosis factor α
Thr	Threonin
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
ZP-1	proteiny zona pellucida

Úvod do problematiky

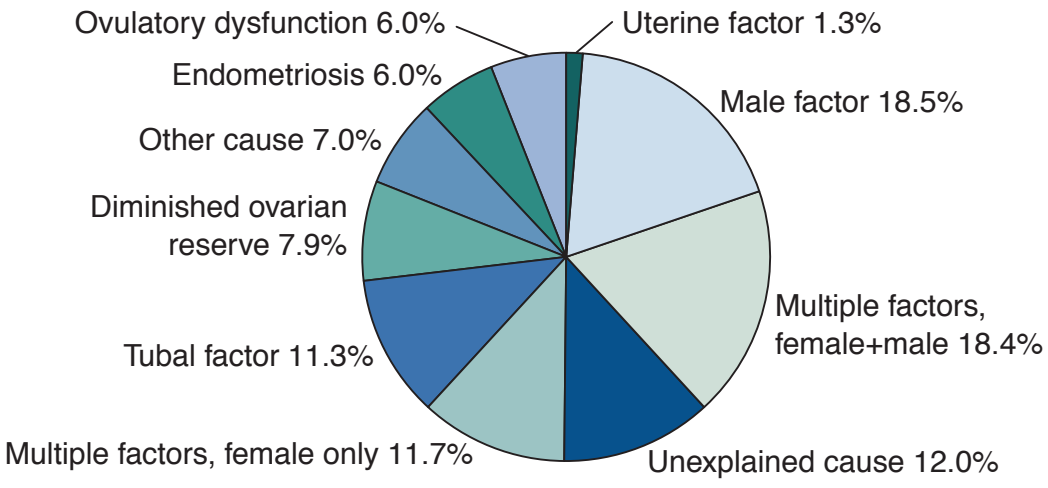
Epidemiologie neplodnosti

Neplodností (sterilitou) rozumíme stav, kdy se páru po minimálně 1 rok nechráněného pohlavního styku nepodaří otěhotnět [1]. Definice neplodnosti ESHRE (Evropské společnosti pro lidskou reprodukci) z workshopu na Capri v roce 1996 předpokládá, že se zdravému páru obvykle podaří dosáhnout těhotenství během 2 let nechráněného pohlavního styku [2]. Pokud se páru nepodaří dosáhnout těhotenství v tomto období, je zahrnut mezi neplodné páry. Je odhadováno, že neplodností v populaci trpí 10-16 % párů [3]. Neplodnost je stav páru. Na mužské ani ženské příčiny neplodnosti by se nemělo nahlížet izolovaně [2].

Příčiny neplodnosti

Příčinou neplodnosti bývá anovulace (porucha vývoje a uvolnění vajíčka), dále andrologický faktor (zhoršení parametrů spermií- koncentrace, pohyblivost, morfologie spermií aj.), tubární (porucha průchodnosti vejcovodů) a peritoneální faktor (např. adhese v okolí vaječníku znemožňující zachycení vajíčka fimbriemi vejcovodu a setkání se spermií), endometrióza nebo imunologicky podmíněná neplodnost. U 15-30 % párů příčinu neplodnosti neprokážeme- hovoříme o idiopatickém faktoru neplodnosti (nevysvětlený faktor neplodnosti) [4].

Graf č.1 Zastoupení příčin neplodnosti dle CDC z roku 2004



Převzato z [1].

Faktory, které se pravděpodobně uplatňují u idiopatické neplodnosti jsou:

- Kvalita oocytů [5]
- Kvalita spermií, např. zvýšená DNA fragmentace spermií [6]
- Porucha fertilizace, např. porucha vazby spermií na zonu pellucidu [7]
- Porucha transportu gamet a embryí
- Porucha implantace, např. mutace specifických genů endometria [8]

Tyto výše zmíněné faktory nelze zjistit při běžných vyšetřeních, byly prokázané experimentálně.

V průběhu posledních let se *mění také struktura faktorů neplodnosti*. Tím, jak se v současnosti dosažení těhotenství odkládá nad 35 let věku ženy (u řady žen dnes i nad 40 let), se často mění diagnóza funkční anovulace v syndrom předčasného ovariálního selhání [9-11] nebo dokonce syndrom předčasné menopauzy [12, 13]. Ovariální faktor se takto stává jedním z nejdůležitějších příčin neplodnosti.

Počet žen vyššího reprodukčního věku (nad 40 let věku) v Evropě neustále přibývá.

Přitom je vzrůstající věk matky i otce významný faktor snižující pravděpodobnost spontánního otěhotnění [14].

U ženy je již od 30 let prokázána snižující se pravděpodobnost spontánního otěhotnění [15]. Příčinou bývá zhoršení kvality oocytů spíše než selhání implantace [16].

Navíc se zvyšujícím se věkem se zvyšuje i riziko spontánního potratu, především v důsledku genetických faktorů, zvláště trisomií [15, 17].

Riziko spontánního potratu je 8.9 % ve věkové skupině do 25 let oproti riziku 74.7 % u věkové skupiny 45 let [18].

Se vzrůstajícím věkem (nad 30 let) klesá i očekávaná úspěšnost metod asistované reprodukce [19-21].

Ani poslední úspěchy metod asistované reprodukce nemohou zvrátit pokles počtu narozených dětí u žen starších 35 let.

Stejně tak je nutno zdůraznit skutečnost, že u žen vyššího věku stoupá riziko genetických onemocnění u plodů, riziko onemocnění ženy v souvislosti s těhotenstvím (gestační diabetes, arteriální hypertenze, preeklampsie aj.), ale i riziko mateřské a perinatální úmrtnosti [22].

***Všechny tyto důvody vedou k doporučení studií i odborných společností, neodkládat snahu o dosažení těhotenství do vyššího věku partnerů* [23].**

Dalšími nepříznivými faktory, které mohou negativně ovlivnit funkci vaječníků, jsou obesita (nadváha definovaná jako body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m2) [24], nikotinismus, endokrinologicky aktivní chemické látky v životním prostředí (např. bisfenoly, ftaláty, dioxiny, polychlorované bifenyly, polycystické aromatické uhlovodíky aj.), jejichž negativní efekt na ovariální funkci byl experimentálně prokázán [25, 26].

Počty cyklů léčby neplodnosti

Na celém světě v souvislosti s léčbou ovariálního faktoru vzrůstá od 90. let minulého století potřeba stimulovaných ovariálních cyklů a v důsledku zhoršujícího se spermiogramu potřeba intrauterinní inseminace i mimotělního oplodnění s intracytoplasmatickou injekcí (ICSI).

Jinými slovy se neustále zvyšuje počet žen, které léčbu neplodnosti podstupují.

V roce 2010 bylo v USA zdokumentováno provedení 147 260 cyklů mimotělní oplodnění, 47 090 porodů a narození 61 564 živých dětí. [27]. V roce 2001 bylo v USA provedeno 79 042 cyklů mimotělní oplodnění, bylo zaznamenáno 29 585 porodů a narození 41 168 živých dětí [28].

Za posledních deset let se tedy téměř zdvojnásobil počet léčebných cyklů mimotělního oplodnění.

Počty provedených intrauterinních inseminací nejsou dostupné. Udává se, že asi 1 % dětí se v USA rodí po léčbě neplodnosti.

Graf č.2 Regionální přispění cyklů mimotělního oplodnění v roce 2003 do celosvětového registru cyklů asistované reprodukce

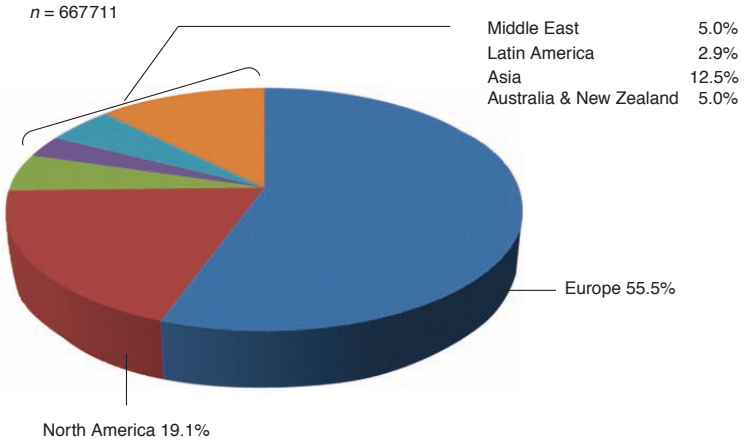


Fig 67.1 Regional contribution of ART cycles to the World Report (2003).

Převzato z [1].

V České republice působí Registr Asistované Reprodukce (RAR) jen několik let. V letošním roce (2013) budou poprvé publikovány počty cyklů asistované reprodukce, počty porodů a počty vícečetného těhotenství za rok 2011.

Odhaduje se, že asi 4 procenta dětí se v České republice rodí po léčbě neplodnosti.

Současný stav indukce ovulace gonadotropiny

Pro páry s idiopatickým faktorem neplodnosti, mírným andrologickým faktorem a pro ženy s normogonadotropní anovulací, které neotěhotní po podání klomifencitrátu, je doporučována ***indukce ovulace gonadotropiny společně s intrauterinní inseminací*** [4, 29].

Použití gonadotropinů zvyšuje pravděpodobnost dosažení těhotenství na základě podpory vývoje jednoho, dvou i více folikulů a dosažení ovulace [30].

Na druhé straně je důsledkem multi-folikulárního vývoje reálné riziko vícečetného těhotenství (15-20 % riziko dvojčetného a 5 % riziko trojčetného těhotenství) [31, 32]. V roce 1980 Wang [33] zaznamenal 36.3 % riziko vícečetného těhotenství a v roce 1990 Hamilton-Fairley v souhrnu [34, 35] popsal až 36 % riziko vícečetného těhotenství při použití konvenční počáteční dávky 75 IU gonadotropinů. Takto se ***vícečetné těhotenství*** stává nejčastější komplikací léčby neplodnosti [36]. Vícečetná těhotenství představují významný společenský i zdravotní problém s vyšší incidencí perinatální mortality a vážné neonatální morbidity [37, 38].

Druhou nejčastější komplikací indukce ovulace s multi-folikulárním vývojem je ***ovariální hyperstimulační syndrom*** (OHSS). Jde o vzácný, iatrogenní stav, který se projevuje v luteální fázi cyklu nebo v časném těhotenství [39]. OHSS většinou vzniká na podkladě aplikace gonadotropinů společně s lidským choriovým gonadotropinem k dosažení konečné zralosti vajíček. K rozvoji OHSS se předpokládá *ovariální hypersenzitivita* na gonadotropiny doprovázená rychlým nárůstem estradiolu. Vlivem lokálních faktorů (především *VEGF*) se zvyšuje permeabilita cév a dochází k přesunu tekutin. Závažnost OHSS může být od mírného zvětšení břicha, pocitu plnosti břicha, až k život ohrožujícímu stavu, případně dle literárních údajů i letálnímu stavu s tromboembolismem, selháním funkcí ledvin, plic nebo jater [40]. V 80. letech minulého století byl v souvislosti s indukcí ovulace gonadotropiny OHSS sledován v 8.4 až 23 % v mírném stupni a v 0.5 až 5 % v závažném projevu [39]. V již ve výše zmíněných studiích Wang [33] prokázal 3.9 % a Hamilton-Fairley [35] dokonce 4.6 % riziko OHSS závažného stupně.

Konvenční dávka 75- 150 IU gonadotropinů denně- konvenční step-up protokol

Guzick v roce 1999 používal k indukci ovulace počáteční denní dávku 150 IU ***urinárních gonadotropinů*** na 5-7 dní od dne 3 menstruačního cyklu [41]. Po ověření folikulárního vývoje ultrazvukovým vyšetřením (obvykle v den 8 nebo 9 menstruačního cyklu) dávku případně upravil (při nízké ovariální odpovědi dávku zvýšil o 75 IU). Guzick randomizovaně sledoval 932 párů, prokázal zvýšení pravděpodobnosti dosažení těhotenství 3.2 krát ve skupině žen léčených gonadotropiny s intrauterinní inseminací vs. cervikální inseminace v nativním cyklu. Autor současně sledoval vysoké zastoupení dvojčetného, trojčetného i čtyřčetného těhotenství (18 případů dvojčetného, 4 případy trojčetného a 3 případy čtyřčetného těhotenství ze souboru 186 těhotenství- celkové riziko vícečetného těhotenství bylo 13.4 %).

Také Homburg a Howles [34] doporučovali počáteční dávku 75 IU denně se zvýšením dávky o 75 IU. Randomizovaná studie Dankerta [42] v roce 2007 srovnávala počáteční dávku 75 IU rekombinantního gonadotropinu se 100 mg klomifencitrátu. ***Poprvé bylo potvrzeno významné riziko nadměrné ovariální odpovědi i při použití počáteční dávky 75 IU gonadotropinů denně.*** V této studii bylo zrušeno pro nadměrnou ovariální odpověď 8.6 % cyklů! Zastoupení vícečetného těhotenství (celkově 6 %) bylo vyšší ve skupině s klomifencitrátem (1 dvojčetné a 1 trojčetné těhotenství) v porovnání se skupinou rekombinantního FSH (1 dvojčetné těhotenství).

S nástupem ***rekombinantních gonadotropinů***, které umožňují jemné a přesné dávkování FSH ve formě aplikačního pera, se naplnily předpoklady pro ***individuální dávkování a pro použití nižších počátečních dávek gonadotropinů***. Dávkování je takto možné u folitropinu beta po 25 IU, po praktické stránce denní dávka může být 50, 75 nebo 100 IU.

Dávka 50 IU gonadotropinů denně- low dose step-up protokol

Počáteční dávku 50 IU denně rekombinantních gonadotropinů poprvé studoval Leader [43]. Indikací byla normogonadotropní anovulace (ne syndrom polycystických vaječníků). Počáteční dávka byla pro všechny ženy stejná a autor u 158 žen srovnával zvýšení dávky gonadotropinů v den 8 menstruačního cyklu při nízké ovariální

odpovědi o 25 IU vs. 50 IU denně. Skupina žen se zvýšením dávky o 25 IU měla vyšší incidenci mono-folikulární odpovědi (41.3% vs. 21.8%), vyšší pravděpodobnost dosažení ovulace (81.3% vs. 60.3%) a nižší celkovou spotřebu gonadotropinů (887 IU vs. 984 IU) než skupina se zvýšením dávky o 50 IU. Zvýšení dávky pouze o 25 IU denně snížilo riziko nadměrné ovariální odpovědi z 20 % na 5 %. 5 % cyklů bylo současně zrušeno pro nízkou ovariální odpověď.

Mono-folikulární vývoj- cíl indukce ovulace

Již v roce 2003 Balen [44] navrhl, aby ***cílem použití gonadotropinů v indukci ovulace bylo bezpečné dosažení vývoje pouze jednoho folikulu s porodem jednoho živého plodu.***

I další autoři [45-47] podporují pouze ***mono-folikulární vývoj*** s minimalizací rizika vícečetného těhotenství a OHSS.

Obr. č. 1 Ultrazvukový obraz mono-folikulárního vývoje

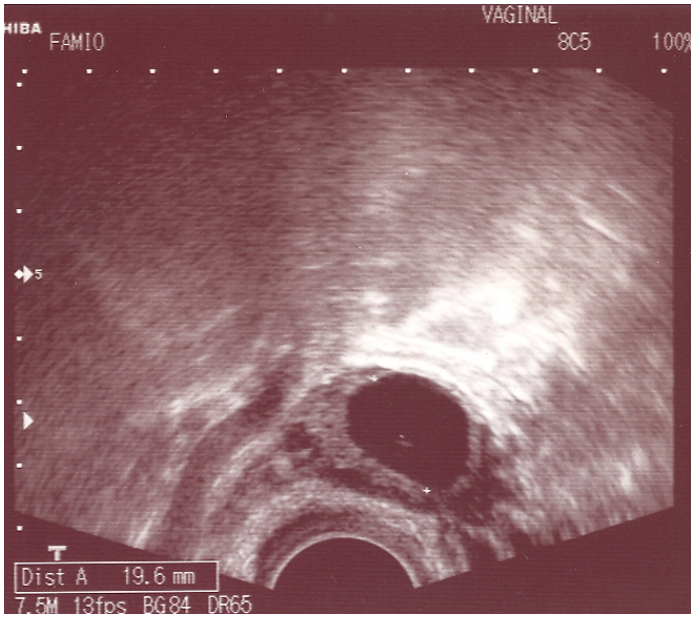


Foto archiv autora.

Cestou k dosažení tohoto cíle je ***snížení dávek gonadotropinů*** na nejnižší dávky ještě účinné [34, 48]. Především doporučení aplikace nízkých dávek gonadotropinů bylo prokázáno jako úspěšné ve snížení rizika vícečetného těhotenství do 2- 6% a také rizika ovariálního hyperstimulačního syndromu [37, 49].

Individualizace léčby

Individualizací léčby rozumíme určení dávky gonadotropinů na základě výsledků objektivních parametrů a testů. V širším slova smyslu navrhujeme typ gonadotropinů, případně stimulační protokol.

Individualizace léčby v porovnání s konvenčním přístupem nabízí vysokou pravděpodobnost přiměřené ovariální odpovědi na podání gonadotropinů, minimalizaci nízké nebo nadměrné odpovědi, s minimalizací rizika vícečetného těhotenství i ovariálního hyperstimulačního syndromu.

Pojem individualizace léčby se poprvé objevil v práci Penziase [50].

V roce 2009 byla publikována práce la Cour Freiesleben [51]. *Jde o* ***první multicentrickou randomizovanou studii na světě hodnotící konvenční a individuální dávkování gonadotropinů u žen s idiopatickou neplodností.*** Studie srovnávala 115 normoovulujících žen se standardní stimulací (dávka 75 IU folitropinu beta) s 113 ženami se stimulací individuální. Individuální dávka 50-100 IU folitropinu beta byla určena na základě nomogramu, který byl založen na tělesné hmotnosti a znalosti počtu antrálních folikulů. Studie prokázala probíhající těhotenství v 21 % vs. 20 %, ale *individuální dávkování snížilo riziko vícečetného těhotenství z 25 % na 5 %!* Autoři konstatují, že ***individuální dávkování folitropinu beta je výhodnější v porovnání s dávkováním standardním ve snížení rizika nadměrné ovariální odpovědi [51].***

Individuální přístup k ovariální stimulaci především se záměrem minimalizace rizik ovariálního hyperstimulačního syndromu navrhuje i Fiedler [52].

Přes všechny systematické snahy o určení správné počáteční dávky gonadotropinů, lékaři stále často spoléhají na svá pozorování a zkušenost [53].

Polymorfismus FSH receptoru

Vysvětlením abnormální odpovědi vaječníků na konvenční dávky gonadotropinů je prokazatelně polymorfismus FSH receptoru.

První mutace genu FSH receptoru byla popsána v roce 1995 u finské rodiny s geneticky vázanou primární amenorheou a charakteristickým fenotypem [54].

Mutace genu FSH receptoru se projevují:

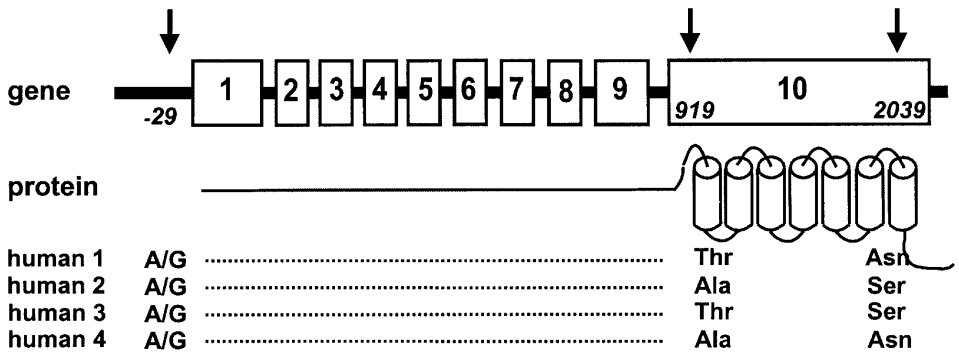
- *Úplnou inaktivací* FSH receptoru. V ojedinělých případech byl popsán nález primární amenorhei, proužkovitých gonád s průkazem primárních folikulů z ovariální biopsie [54].
- *Částečnou inaktivací* FSH receptoru s projevem nízké nebo vysoké ovariální odpovědi v indukci ovulace [55], případně s projevem spontánního ovariálního hyperstimulačního syndromu [56].

Gen FSH receptoru se nachází na chromosomu 2 [57].

Vyhledávání mutací genu FSH receptoru identifikovalo 2 základní polymorfismy FSH receptoru [55] lokalizované na exonu 10 tohoto genu:

- Pozice 307, přítomnost buď Alanin nebo Threonin
- Pozice 680, přítomnost buď Asparagin nebo Serin

Obr. č.2 Alelické varianty FSH receptoru na exonu 10



Převzato z [58].

Vysvětlení abnormální odpovědi vaječníků na konvenční dávky gonadotropinů v důsledku průkazu v polymorfismu FSH receptoru uvádí několik autorů:

V práci [55] autoři vyšetřili bílé krvinky a analyzovali geny FSH receptoru u 161 ovulujících žen mladších 40 let a prokázali zastoupení 29 % variací Asn/Asn, 45 % variací Asn/Ser a 26 % variací Ser/Ser. V průběhu ovariální stimulace dlouhým GnRH agonistickým protokolem hodnotili hladiny FSH, koncentraci estradiolu, počet folikulů, počet získaných oocytů a celkovou spotřebu gonadotropinů. Prokázali statisticky významné odlišnosti mezi skupinami: bazální koncentrace FSH byla 6.4 ± 0.4 IU/l, 7.9 ± 0.3 IU/l a 8.3 ± 0.6 IU/l resp., celková spotřeba gonadotropinů daná spotřebou ampulí byla 31.8 ± 2.4, 40.7 ± 2.3, 46.8 ± 5.0 IU/l resp. Studie prokázala nízkou ovariální odpověď u FSH receptoru Ser/Ser a naopak nejvyšší ovariální odpověď u FSH receptoru *genotypu Asn/Asn.*

Studie [59] prokázala, že pacientky s *nízkou ovariální odpovědí* mají signifikantně vyšší zastoupení varianty Ser/Ser FSH receptoru (44.5 %), kdežto pacientky s dobrou ovariální odpovědí mají vyšší zastoupení varianty Asn/Ser ($p < 0.05$). Výsledky studie naznačují, že *genotyp Asn/Ser* u žen s dobrou ovariální odpovědí je spojen s vyšší senzitivitou FSH receptoru v porovnání s ostatními variantami receptoru.

Studie v souhrnu potvrzují skutečnost, že polymorfismy FSH receptoru existují i mezi ženami s normálními hormonálními hladinami.

Také Johnson [60] uvádí existenci alespoň 4 polymorfismů FSH receptoru.

V souhrnné práci [58] Simoni konstatuje, že abnormality genu FSH receptoru vykazují mírné rozdílu v účinku *in vivo*, které ale dosud nebylo možno prokázat v *in-vitro* experimentech.

Tradiční pojetí folikulogeneze

V průběhu intrauterinního vývoje (od 5. týdne) dochází k migraci primordiálních zárodečních buněk z entodermu do zárodečné lišty. Přesný mechanismus tohoto děje není znám. Předpokládá se vliv chemotaktických podnětů. Zárodečné buňky v jiné lokalizaci než v zárodečné liště nepřežívají [61]. V zárodečné liště, z které se později vyvine vaječník, se tyto zárodečné buňky (nyní již nazývané oogonie) mitoticky množí. V obou vaječnících se v té době nachází 6- 7 000 000 oogonií. Z célomu následně migrují buňky, které vytváří obal okolo oogonií. Tím vzniká primordiální folikul. Od 8.-11. týdne část oogonií zahajuje I. meiotické (zrací) dělení, které je zastaveno v diplotenním stádiu. Tím se oogonie mění v *primární oocyty*. Druhá část oogonií pravděpodobně I. meiotické dělení zahajuje později [62]. Je pravděpodobné, že vstup do I. zracího dělení dočasně chrání oogonie před atrézií. Oogonie, které nevstoupí do I. zracího dělení do 7. měsíce vývoje, podléhají atrézii. Takto v době porodu již není přítomna žádná oogonie [61].

V době porodu vaječník obsahuje 1 000 000 oocytů, ostatní oocyty podléhají *atrézii*. Mechanismem atrézie je *apoptóza*.

S nástupem puberty ovárium obsahuje již jen 400 000 – 500 000 oocytů. Ztráta folikulů se odhaduje 1 000 za měsíc, je zvýšená po 35. roku věku. V období pohlavní zralosti se vytváří kohorta rostoucích folikulů. Jeden z folikulů pokračuje v růstu (dominantní folikul), zatímco ostatní podstupují proces atrézie a zanikají.

U většiny žen dochází k ovulaci pravidelně, za život ženy proběhne ovulace řádově 475x [63].

V tradičním pojetí je folikul charakterizován velikostí a morfologickou strukturou:

- Primordiální folikul
- Primární folikul
- Sekundární (antrální) folikul
- Dominantní (Graafův) folikul

Primordiální folikul

Primordiální folikuly nacházíme v kůře vaječníků. Primoridální folikul má velikost 40 μm, jeho stěna je tvořena jednou vrstvou plochých (folikulárních) buněk. Uvnitř primordiálního folikulu nacházíme primární oocyt. V primárním oocytu jsou již prokazatelné jaderné změny I. zracího dělení [61].

Primární folikul

Primární folikul má velikost 100 μm, jeho stěna je tvořena jednou vrstvou kubických buněk. Buňky kubické se diferencují v metabolicky aktivní buňky granulózové. Membrána, která odděluje primární oocyt a buňky granulózy od okolního stroma se nazývá *lamina basala* [61].

Sekundární folikul

Sekundární folikul má velikost 200 μm, jeho stěna je tvořena několika vrstvami kubických buněk (buňky granulózy). Předpokladem dalšího vývoje folikulu je vytvoření krevního zásobení a stroma okolo lamina basala. Stroma se dále dělí na théka externa (zůstávají stromální buňky) a théka interna s expresí receptorů pro LH [61].

Terciální (dominantní, Graafův) folikul

Graafův folikul má velikost 400 μm, je charakterizován přítomností dutiny (antrum). Tato dutina se v průběhu růstu folikulu zvětšuje. Okolní buňky granulózy se dostávají k obvodu folikulu. V buňkách granulózy i théky pokračuje exprese specifických receptorů a syntéza jejich produktů.

Z funkčního pohledu vývoj folikulů dělíme na:

- Stádium preantrální
- Stádium antrální

Stádium preantrální

Preantrální stádium je charakterizováno vývojem folikulů bez závislosti na gonadotropinech (gonadotropin independentní stádium). Preantrální folikuly neobsahují receptory pro FSH, ani pro LH. Tato část vývoje folikulů je závislá na genetických faktorech a je modulována růstovými působky (vliv vaskulárních, růstových faktorů a jejich receptorů). Např. GDF-9, podporuje mitózu

ve folikulárních buňkách [64]. Již v primordiálním folikulu nacházíme spojení mezi folikulárními buňkami, tzv. *spojovací komplexy – gap junction.* Tyto spojovací komplexy jsou mimořádně důležité mezi oocytem a buňkami granulózy. Propojují buňky navzájem a vytváří jednotný útvar- syncytium [61].

Význam spojovacích komplexů (gap junction) v interakcích mezi oocytem a buňkami granulózy:

- Difuse iontů
- Výměna metabolitů
- Transport nízkomolekulárních signálních molekul, jako např. cAMP a kalcicum

Gap junction jsou mezibuněčné kanály složené z proteinu zvaný connexin. Existuje nejméně 13 členů rodiny connexinů. Důležitý je např. connexin 37, který vytváří gap junction mezi vajíčkem a okolními buňkami granulózy, či mezi buňkami granulózy navzájem.

V tomto stádiu také buňky granulózy syntetizují a uvolňují mukopolysacharidy, které vytváří „halo“ v okolí oocytu a nazývá se *zona pellucida* .

Primární oocyty zůstávají v profázi I. zracího dělení až do ovulace. Přesný mechanismus tohoto děje není znám, ale předpokládá se působení místních faktorů- *inhibitorů zracího dělení*, zřejmě původu z buněk granulózy [61].

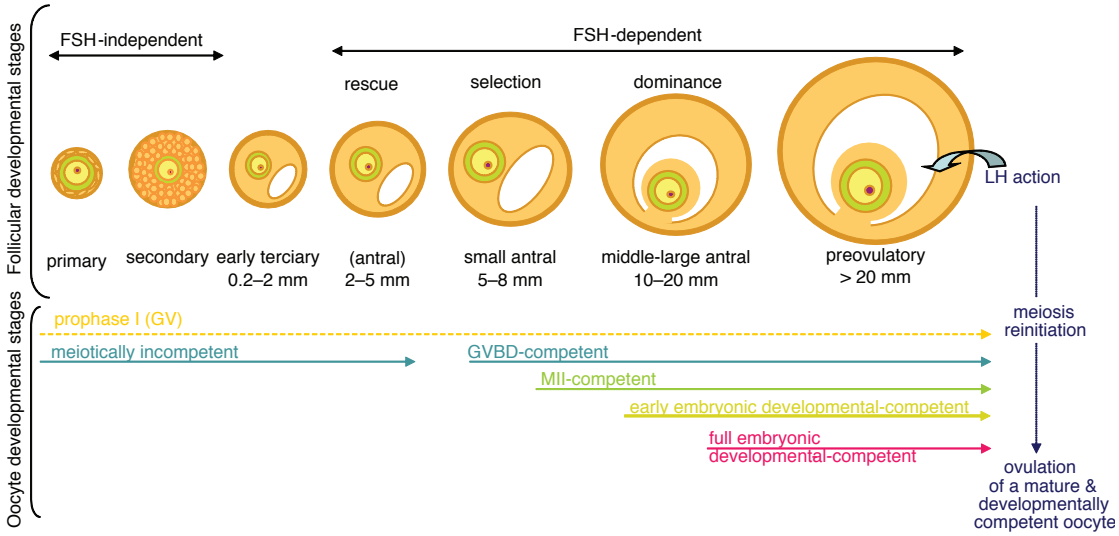
Během preantrálního stádia se folikul přetváří z folikulu primordiálního do folikulu primárního. Proces zrání folikulu začíná 3 měsíce před ovulací, kdy je určena kohorta 300 folikulů pro růst a vývoj.

Stádium antrální

Antrální stádium je charakterizováno vývojem folikulů s řízením gonadotropinů. Vstupuje do něj řádově 30 folikulů, ostatní folikuly (90 %) v procesu vývoje podlehnou atrézii. Folikuly již obsahují receptory pro FSH i LH. Pod vlivem FSH folikuly přeměňují androgeny na estradiol, který prokazujeme intrafolikulárně i v krvi. Folikuly s malým počtem FSH receptorů podléhají atrézii.

Jinak vyjádřeno, existuje představa o nutnosti působení FSH na záchranu antrálních folikulů před degenerací [60, 65].

Obr. č. 3 Preantrální a antrální stádium vývoje folikulů



Převzato z [1].

Antrální folikul rychle roste, jeho průměr se zvýší 15 krát než doroste do stádia Graafova folikulu.

Počet buněk granulózy se zvýší 600 krát.

Vytváří se dutina (*antrum*) bohatá na proteiny, steroidní hormony, proteiny z plasmy i lokálního původu a elektrolyty.

Při průměru folikulu 400 μm začínají být zřetelné *lacuny* (další drobné dutinky) v buňkách granulózy. Postupně se připojují k antru a následně ponechávají primární oocyt obklopen jen 2-3 vrstvami buněk granulózy- *cumulus oophorus* [61].

Ovulace

V přirozeném cyklu u rostoucího folikulu ovulaci předchází zvýšená mitotická aktivita granulózových buněk, zvýšená syntéza a aktivita aromatázy vedoucí k přeměně androstendionu na estradiol. Dále se zvyšuje počet LH receptorů v cílových buňkách a tím se zvyšuje i jejich senzitivita k LH. Produkovaný estradiol se dostává do folikulární tekutiny.

Ovulace následně zahrnuje komplex dějů, kdy při vysoké hladině estradiolu dochází k náhlému a rychlému zvýšení koncentrace LH (LH puls) a vlivem prostaglandinů dochází k ruptuře stěny dominantního folikulu, konečnému dozrání oocytu (dokončení I. a zahájení II. zracího dělení do stádia metafáze) a jeho uvolnění z folikulu.

Zvýšené prokrvení a zvýšená permeabilita dominantního folikulu (pod vlivem prostaglandinů, progesteronu a dalších místních působků) umožňuje v jeho stěně dále akumulovat cirkulující gonadotropiny, dále ve vysoké míře produkovat estradiol a pokračovat ve vývoji, zatímco ostatní folikuly podléhají atrézii [66].

Hormonální mechanismy folikulogeneze

Je dobře známo, že pro vývoj folikulu, konečnou maturaci a uvolnění oocytu je nezbytná součinnost mezi hypothalamickými hormony (GnRH), hypofyzárními hormony (FSH a LH) společně s intraovariálními místními působky, např. IGF-1, AMH, inhibin, aktivin aj. [63, 67, 68]. Současně tyto hormony i místní faktory koordinují a regulují endokrinní funkce vaječníků [59, 69, 70].

V posledních 15 letech bylo publikováno mnoho nových poznatků o regulaci vývoje folikulů. Nové laboratorní metody jako např. imunocytochemická přímá vizualizace proteinů ve tkáních, in situ hybridizace pro in situ průkaz DNA nebo RNA, uplatnění assay pro přesné stanovení hladin steroidů a peptidů v krvi, nebo in vitro kultivace lidských ovariálních buněk, přinesly nové informace o endokrinních, parakrinních autokrinních faktorech uplatňujících se v průběhu folikulogeneze. Fauser doufá, že znalost těchto mechanismů pomůže k rozvoji více účinných a současně bezpečných protokolů ovariální stimulace v léčbě neplodnosti [63].

Pro bezchybný průběh folikulogeneze je mimořádně důležitá správná funkce jednotlivých genů a následně správné formování hormonálních receptorů *[71]*.

Gonadotropin uvolňující hormon (GnRH)

GnRH je decapeptid: Glu^{1}-His^{2}-Trp^{3}-Ser^{4}-Tyr^{5}-Gly^{6}-Leu^{7}-Arg^{8}-Pro^{9}-Gly^{10}-NH_2.

GnRH je tvořen v neurosekrečních buňkách *hypotalamu (nukleus arcuatus)*.

GnRH se vylučuje do portálního systému a váže na specifický receptor na buňkách gonadotrofů (buňky syntetizující, shromažďující a uvolňující FSH, LH) *v hypofýze*. Receptor pro GnRH je tvořen proteinem G, který působí 2 mechanismy: (i) stimuluje fosfolipázu Cβ (PLC-β) k hydrolýze fosfatidylinositol fosfátu (PIP_2) na 1,4,5- trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG), který uvolňuje Ca^{2+} a aktivuje protein kinázu C (PKC) a dále cytoplasmatickou kaskádu kináz; (ii) moduluje aktivitu adenylcyklázy (AC) a tím i množství cAMP.

Gonadotrofy v 60 % obsahují jak FSH i LH, v 18 % jen LH a v 22 % pouze FSH. Experimenty s klonováním receptoru umožnily osvětlit strukturu a vazebná místa receptoru. Obsazení jen 20 % vazebných míst receptoru je dostatečné k vyvolání 80

% biologické odpovědi. Uvolnění FSH i LH z gonadotrofů probíhá cyklicky. GnRH je degradován v lysozomech.

GnRH je uvolňován v pulsech do portálního systému. Jakákoli abnormalita GnRH syntézy, uskladnění, uvolnění a aktivity vede ke změně sekrece gonadotropinů ke ztrátě ovariální funkce.

Experimenty na geneticky modifikovaných myších GnRH $^{-/-}$ nebo myších imunizovaných proti peptidu prokázaly atrofie gonád.

Po odstranění endogenní sekrece GnRH, např. při zničení mediobazálních jader hypothalamu, může být sekrece FSH i LH obnovena substitucí GnRH infůzní pumpou specificky naprogramovanou. Na druhé straně tonické podání syntetického hormonu GnRH neobnoví pravidelný menstruační cyklus u žen [60].

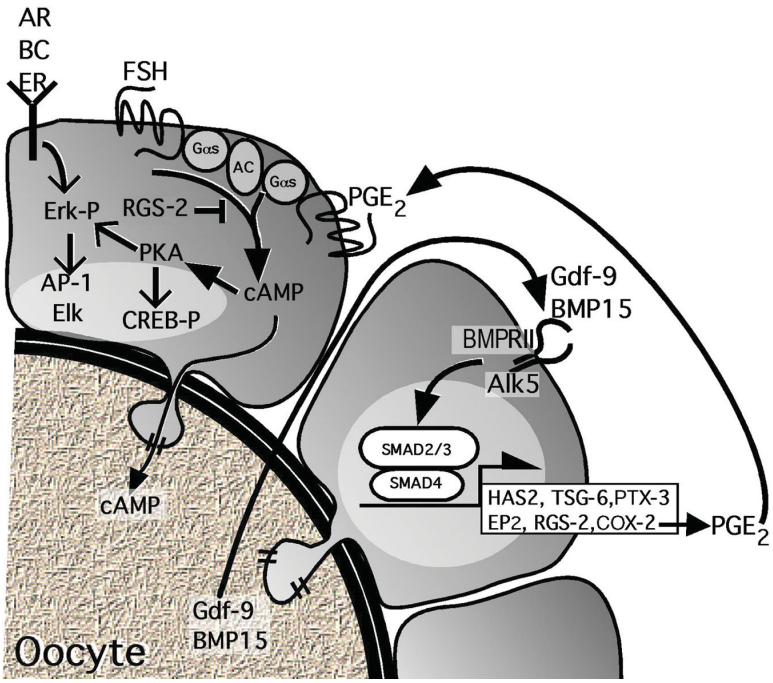
Folikulostimulační hormon (FSH)

Folikulostimulační hormon je glykoprotein. FSH je složen z identického řetězce α a specifického řetězce β. FSH je syntetizován gonadotrofy předního laloku hypofýzy.

Hladiny folikulostimulačního hormonu jsou nízké v období před pubertou, s nástupem puberty, v souvislosti s pulzatilní sekrecí GnRH, se zvyšují.

Folikulostimulační hormon působí vazbou na FSH receptor na *granulózových buňkách ovárií*. Tak jako receptor pro GnRH, je i FSH receptor tvořen proteinem G, který stimuluje buď fosfolipázu Cβ (PLC-β) k hydrolýze fosfatidylinositol fosfátu (PIP_2) na 1,4,5- trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG), k uvolnění Ca^{2+} a k aktivaci protein kinázy C (PKC); nebo moduluje aktivitu adenylcyklázy (AC) a tím i množství cAMP.

Obr. č. 4 FSH receptor v kumulárních buňkách myší



Převzato z [72].

Po aktivaci receptoru dochází k urychlení mitotické aktivity buněk granulózy, ke zvýšené produkci enzymů nezbytných pro *steroidogenezu* (zvýšená syntéza a aktivita aromatázy vedoucí k přeměně androstendionu na estradiol). Bylo prokázáno zvýšení produkce estradiolu z androstendionu o 600 %. Regulaci sekrece FSH zajišťuje zpětně estradiol a inhibin. Dále se zvyšuje počet LH receptorů v buňkách granulózy a tím se zvyšuje jejich senzitivita k LH.

FSH receptor byl prokázán nejenom na folikulu, ale také na *vajíčkách* a *embryích* ve stádiu blastocyst. Tím byla naznačena role FSH v mechanismech genetického dozrání vajíčka (z metafáze I. zracího dělení do metafáze II.) a časného embryonálního vývoje [59].

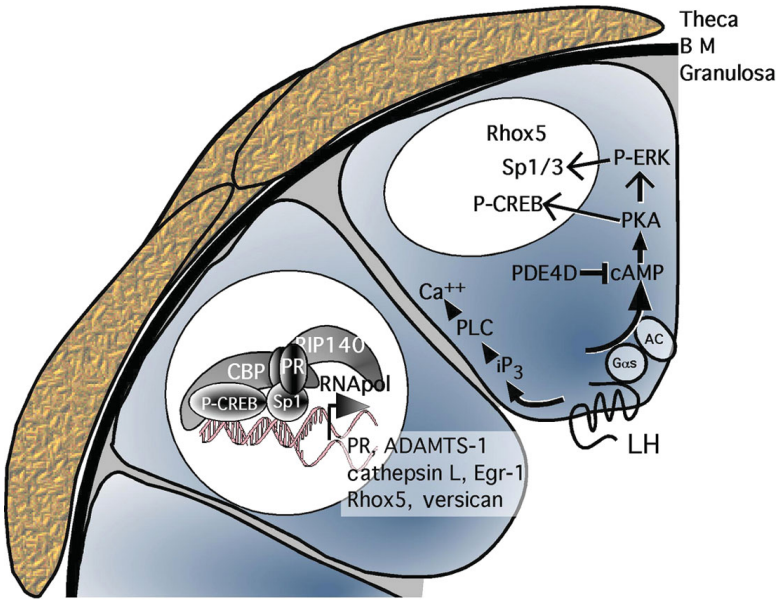
V časné folikulární fázi je nezbytné *zvýšení FSH pro záchranu 1 dominantního folikulu*, respektive získání až 30 antrálních folikulů k vývoji během indukce ovulace. Čím větší je dávka exogenního FSH, tím větší počet folikulů můžeme zachránit před degenerací a získat k dozrání. Nedostatek FSH vede k atrézii folikulů.

Osud folikulu je závislý na schopnosti vázat dostupný FSH na specifické receptory na buněčné membráně („FSH threshold“) a stupni androgenicity uvnitř folikulu [60].

Luteinizační hormon (LH)

Luteinizační hormon je glykoprotein, složený také z identické podjednotky α a specifické podjednotky β. LH je také syntetizován gonadotrofy předního laloku hypofýzy, což bylo prokázáno imunocytochemickými studiemi. LH se váže na receptory *thékálních buněk ovária*. Výsledkem je zvýšená mitotická aktivita a tvorba thékálních buněk, vyšší tvorba androgenů a zvýšení počtu LH receptorů [60]. Nadbytek LH se zvýšenou koncentrací intrafolikulárních androgenů vede k atrézii folikulů [73].

Obr. č 5 LH receptor v buňkách granulózy u myší



Převzato z [72].

Existuje představa o two-cell, two-gonadotropin model (2 specializované gonadotropní buňky produkující 2 specifické hormony, FSH a LH) *[60].*

Estradiol

Estradiol nebo také 17-β estradiol je steroidní hormon produkovaný buňkami granulózy.

Estradiol se váže na specifické steroidní nitrobuněčné receptory v cílových buňkách.

Zvýšení koncentrace estradiolu vede procesem nazývaným *negativní zpětná vazba* („negative feedback“) k supresi sekrece gonadotropinů. Např. je známo, že po odstranění vaječníků nebo v menopauze se významně zvyšují koncentrace cirkulujícího FSH i LH. Substituce estradiolu infůzí vede k rychlému snížení FSH i LH [60].

Pozitivní zpětnou vazbou („positive feedback“) rozumíme rychlý pulz LH a FSH při výrazném zvýšení plasmatických koncentrací estradiolu, např. při ovulaci 200-400 krát.

Souhrnem estradiol v nízkých plasmatických koncentracích rychle působí mírné zvýšení gonadotropinů (FSH i LH obvykle do 40 IU/l). Ve vysokých koncentracích trvajících 48 hodin estradiol vede k výraznému a rychlému zvýšení koncentrací především LH i FSH (LH a FSH pulz).

Progesteron

Progesteron je steroidní hormon produkovaný buňkami théky.

Progesteron se váže na specifické steroidní nitrobuněčné receptory v cílových buňkách.

Progesteron při vysokých plasmatických koncentracích snižuje obdobně jako estradiol mechanismem negativní zpětné vazby koncentraci FSH a LH. Na druhé straně je při vysokých koncentracích progesteronu blokována pozitivní zpětná vazba, takže injekce estradiolu u ženy během luteální fáze menstruačního cyklu nenavodí LH vrchol [60].

Aktivin

Aktivin je další ovariální lokální působek z rodiny TGF- β. Aktivin A je homodimer složený z β_A-podjednotek ($\beta_A\beta_A$), aktivin B je homodimer složený z β_B-podjednotek ($\beta_B\beta_B$), aktivin AB je heterodimer složený z β-podjednotek ($\beta_A\beta_B$).

Aktivin je antagonistou inhibinů a vazbou na aktivinové receptory hypofýzy podporuje sekreci FSH [74]. Není jisté, zda podporuje i uvolnění LH. Stejně tak není jisté přímé působení aktivinu na hypotalamus. Aktivin dále působí jako silný inhibitor syntézy androgenů v malých folikulech [60].

Inhibin A a B

Inhibin A a B jsou podobně jako aktivin faktor z rodiny TGF- β [75]. Inhibin je glykoprotein složený ze dvou podjednotek, α a β. Inhibin A je komplex $\alpha\beta_A$, inhibin B je komplex $\alpha\beta_B$.

Oba inhibiny jsou produkovány buňkami granulózy ovária. V malých množstvích vzniká inhibin i v hypofýze, míše, mozku, ledvinách, nadledvinkách a placentě. Z inhibinů ovariálního původu inhibin A vzniká v dominantním folikulu a ve žlutém tělísku. Inhibin B je uvolňován malých (preantrálních) folikulech [74].

Inhibin A a B selektivně ovlivňuje hladinu FSH. Jsou významných regulátorem syntézy a uvolnění FSH (snižují hladinu FSH) a vykazují i parakrinní a autokrinní účinek v ovariální tkáni i v tkáních mimo ovária [60]. Inhibin blokuje uvolnění aktivinem stimulovaného FSH [74]

Aktivin i inhibin se spolupodílí na regulaci funkce buněk granulózy a théky.

Follistatin a α_2-Macroglobulin jsou vazebnými proteiny pro inhibin i aktivin.

Follistatin vykazuje vysokou afinitu k aktivinu a neutralizuje jeho biologický efekt na hypofýzu. Výsledný účinek je podobný účinku inhibinu.

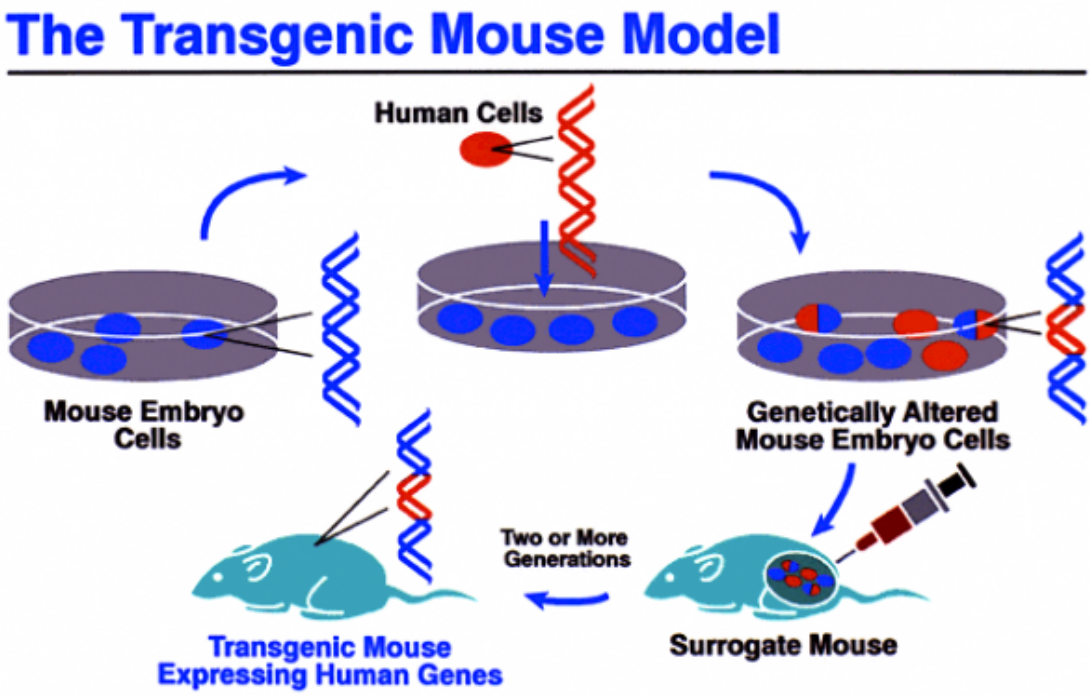
α_2-Macroglobulin je vazebný protein bez biologického účinku [74].

Model transgenních myší

Díky animálním studiím bylo získáno mnoho poznatků o genech, které kontrolují vývoj ovárií, folikulů a oocytů. Specifické geny jsou odpovědné za nábor (recruitment) primordiálních folikulů, růst folikulů z preantrálního do antrálního stádia, selekci dominantního folikulu a dosažení ovulace. Model transgenních myší nabízí kontrolu exprese požadovaných genů. Expresi genů je možno zcela eliminovat (knock-out), snížit nebo zvýšit.

Vyřazení specifického genu, např. v modelu transgenních myší (*transgenic mouse model*) umožňuje přesně popsat poruchu folikulogeneze.

Obr. č 6 Model transgenních myší

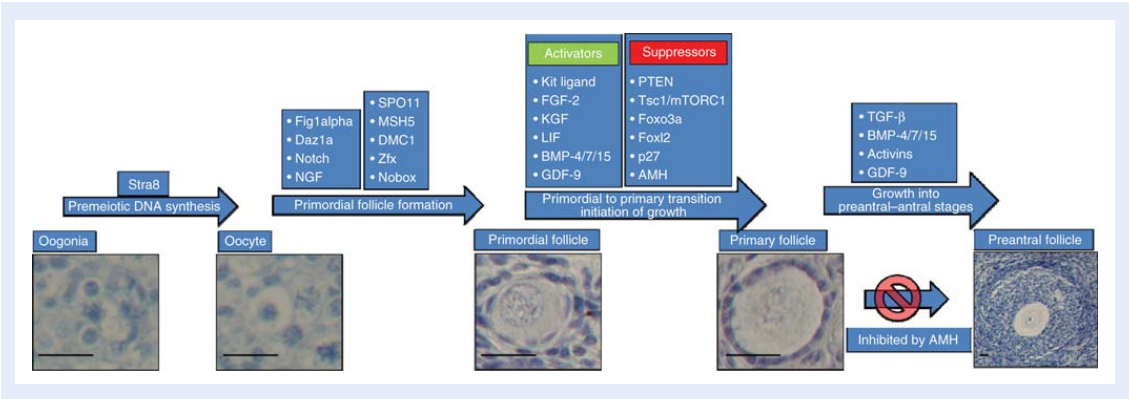


Dostupné z [76] cit. 2013-01-28

Molekulární (signálové) mechanismy folikulogeneze

Jak jsme již zmínili výše bylo publikováno mnoho nových poznatků o regulaci vývoje folikulů i nových informací o endokrinních, parakrinních i autokrinních faktorech, které se uplatňují v průběhu folikulogeneze. Byla prokázána mistrná součinnost všech faktorů v procesu náboru (recruitment), selekci a růstu folikulů z primordiálního stádia k zajištění ovulace a formování žlutého tělíska [77].

Obr. č. 7 Přehledné zobrazení faktorů zahrnutých v řízení folikulogeneze



Převzato z [78]

Musíme si být vědomi skutečnosti, že tkáňově specifický účinek hormonu závisí na přítomnosti hormonu i expresi specifického receptoru. Především v reprodukci se míra exprese receptoru dosahuje ovlivněním množství receptoru dostupného vázat hormon nebo strukturálními změnami receptoru jako důsledek posttranslačních modifikací [60].

V konceptu folikulogeneze v preantrálním stádiu je prokázaná klíčová role oocytu v přeměně folikulu primordiálního v primární.

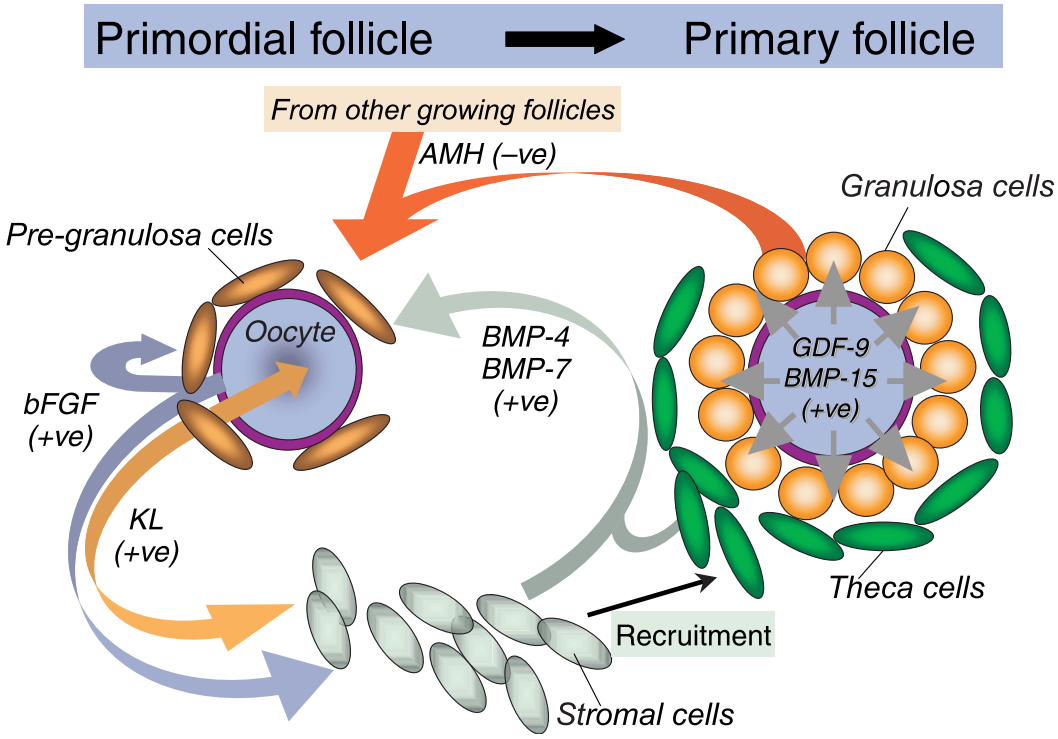
Primární folikul

Přeměna primordiálního folikulu ve folikul primární je řízena:

- Působky jiných rostoucích folikulů v okolí, např. AMH
- Působky stromálních buněk, např. BMP-4 a BMP-7
- Působky vznikajících přímo v oocytu, především GDF-9 a BMP-15
- Působky ostatní, např. *Dazla* gen, gen *Fig1alfa, NGF*

Jde o místní faktory patřící mezi skupinu TGF- β [64]. Jak faktory stromálních buněk (BMP-4 a BMP-7), tak i faktory oocytárního původu (GDF-9 a BMP-15) mají pozitivní efekt na *mitotické dělení granulózových buněk*. Negativní účinek na stejný proces vykazuje AMH [77].

Obr. č. 8 Signálové interakce ve vývoji primárního folikulu



Převzato z [77].

Z řady zmíněných působků se podrobně věnujme AMH, GDF-9 a BMP-15.

Anti-Müllerianský hormon (AMH)

AMH je faktor produkovaný buňkami granulózy. AMH zpomaluje mitotické dělení okolních folikulárních buněk [79].

Na transgenních myších modelech s nadměrnou expresí AMH autoři prokázali, že vysoká hodnota AMH mění vaječníky ve vazivové lišty bez přítomnosti zárodečných buněk.

Studie, které zkoumaly nedostatek AMH používaly AMHKO myši (AMH Knock Out). Nedostatek AMH u samic nejprve neovlivnil fertilitu a později byl pozorován

rychlejší úbytek primordiálních folikulů (v 16 měsíci byla ovulace ukončena u 56 % AMHKO myší vs. 18 % zdravých myší).

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)

GDF-9 je faktor oocytárního původu s pozitivním působením na *mitotické dělení granulózových buněk*.

Ve zvířecích experimentech byly identifikovány genové mutace GDF-9, které u ovcí vedly k neplodnosti. Stejně tak byly vyšlechtěny *GDF9* Knockout myší linie. Tyto myši byly fenotypicky normální, ovária byla významně drobná a ve vzorcích nebyly přítomny primární folikuly. Byla prokázána ztráta schopnosti mitotického dělení buněk granulózy. Oocyty těchto myších linií nejevily odlišnosti oproti oocytům kontrolním při studiu průběhu meiózy.
Podobně byly i u lidí prokázány genové mutace obou faktorů ve spojení s předčasným ovariálním selháním [64].

Kromě podpory růstu folikulárních buněk mají výše popsané působky efekt na *inhibici produkce progesteronu* v buňkách granulózy.
Ve zvířecích experimentech byla prokázaná spontánní luteinizace buněk granulózy po odstranění inhibičního vlivu oocytu.

Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15)

BMP-15 je druhým faktorem oocytárního původu s podporou *mitotického dělení granulózových buněk*. BMP-15 také inhibuje aktivitu FSH supresí exprese FSH receptoru v buňkách granulózy.

Podobně jako genové mutace GDF-9 ve zvířecích experimentech i u BMP-15 byly identifikovány mutace, které u ovcí vedly k neplodnosti [64].

Dazla

Dazla je cytoplasmatický faktor, nezbytný pro vývoj primordiálních folikulů.

V transgenních modelech jeho nepřítomnost početně redukuje zárodečné buňky, způsobuje kompletní nepřítomnost folikulů a vajíček v ováriích dospělých myší [70].

In the germ line alfa (Fig1alfa)

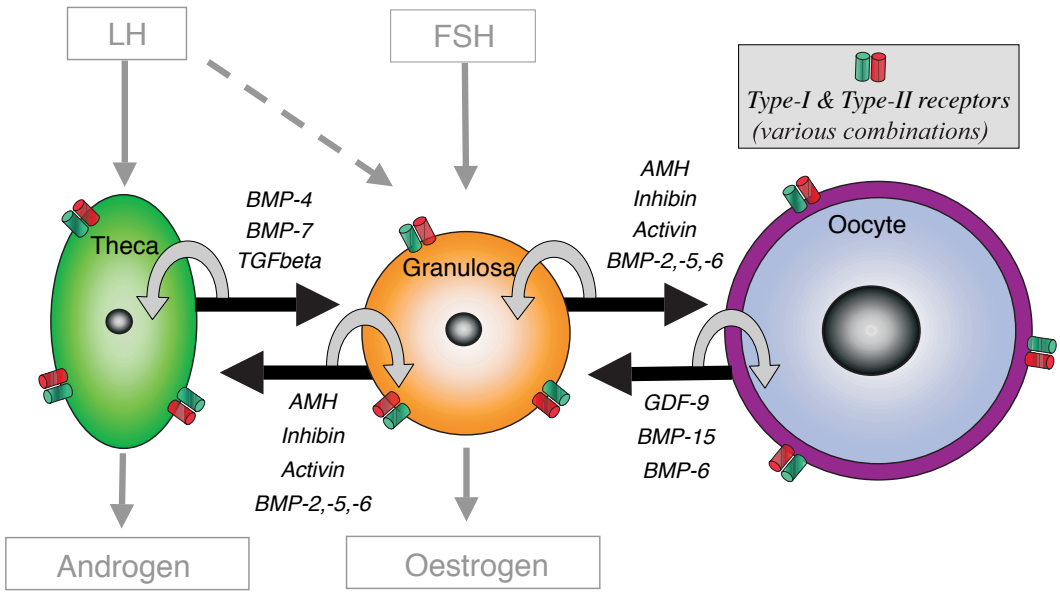
Fig1alfa je další důležitý působek pro vývoj primordiálních folikulů.

Fig1alfa $^{-/-}$ samice jsou neplodné navzdory přítomnosti normálního množství kompetentních zárodečných buněk v embryonálních ováriích. Dále např. gen *Fig1alfa* kontroluje syntézu transkripčního faktoru, který následně má vliv na formování zony pellucidy, zvláště glykoproteinů extracelulární matrix zony pellucidy ZP1-3 [70].

Sekundární folikul

Kromě faktorů již popsaných u vývoje primárního folikulu (GDF-9, BMP-15 a AMH) se v průběhu vývoje sekundárního folikulu projevují i působky nové, typické pro toto vývojové stádium folikulu (IGF-1, aktivin A a B).

Obr. č. 9 Signálové interakce ve vývoji sekundárního folikulu



Převzato z [77].

GDF-9, BMP-15, AMH

Ve stádiu sekundárního folikulu GDF-9 také působí na *buňky granulózy a ovlivňuje jejich proliferaci*, účastní se *řízení FSH indukované steroidogeneze* a i *exprese receptoru pro LH v buňkách théky* [64]. AMH produkovaný rostoucími folikuly inhibuje vývoj okolních folikulů [77] a modifikuje odpověď rostoucího folikulu k FSH [71].

Insulin like growth factor 1 a 2 (IGF-1 a 2)

IGF-1 je významný faktor v regulaci vývoje antrálního (sekundárního) folikulu.

IGF-1 je intraovariální systém, který pravděpodobně zvyšuje, znásobuje nebo tlumí efekt FSH u jistých folikulů. Lidské granulózové buňky pravděpodobně sami IGF netvoří, ale vytváří IGF vazebné proteiny. Tím soutěží o volný IGF produkovaný játry a regulují množství IGF-1 dostupného ve folikulu [71]. Dále IGF-1 působí jako modulátor steroidogeneze- stimuluje aktivitu aromatázy v buňkách granulózy buď samostatně, nebo ve spojení s FSH. V thékálních buňkách IGF-1 podporuje produkci 17α-hydroxyprogesteronu [69].

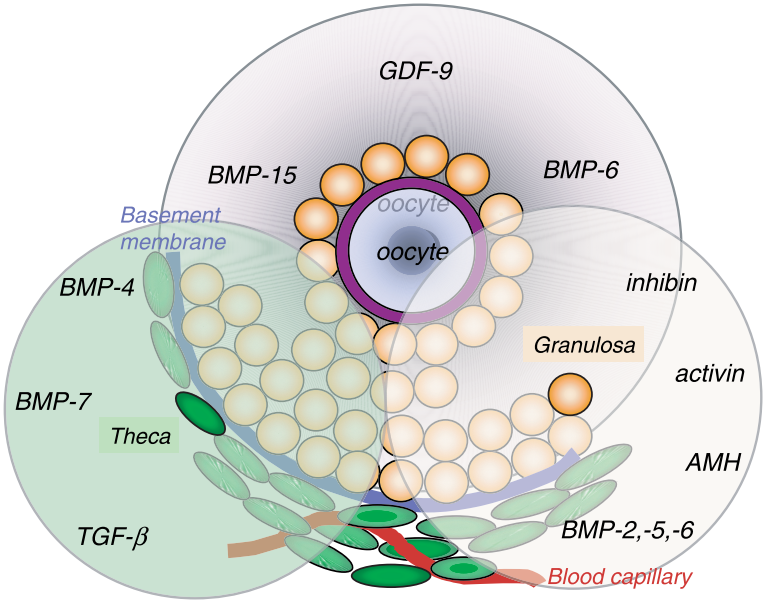
Aktivin A a B

Aktivin A je již zmíněný ovariální lokální působek z rodiny TGF- β.

Kromě již zmíněné podpory sekrece FSH [74], působí jako inhibitor LH-indukované produkce progesteronu buňkách granulózy a tím inhibuje spontánní luteinizaci [70].

Aktivin B je také syntetizován v buňkách granulózy a stimuluje další proliferaci těchto buněk [70].

Obr. č. 10 Intraovariální signálové interakce mezi buňkami granulózy a théky



Převzato z [77].

Konečné zrání Graafova folikulu

GDF-9 i faktor BMP-15 jsou přítomny společně ve většině stádiích folikulárního růstu i u konečného stádia zrání folikulu.

GDF-9 tak působí v součinnosti s BMP-15 a *stimulují mitózu buněk granulózy* [64].

GDF-9 pomáhá několika mechanismy regulovat koncentraci a účinek androgenů:

- Podporou tvorby estradiolu v buňkách granulózy aromatizací androgenů.
- Modulací přímého účinku androgenů na růst a diferenciaci buněk granulózy. Androgeny jsou funkčně spojeny s vazebnými místy pro FSH a IGF-1.

Tímto působením GDF-9 významně podporuje účinek IGF-1.

I u lidí mutace genu BMP-15 (podobně jako mutace genu GDF-9) vedly k poruše vývoje folikulů až k projevům předčasného ovariálního selhání. Ojedinělý případ byl popsán v roce 2004, kdy autoři zaznamenali 2 sestry s mutací genu BMP-15, kterou získali od jejich otce. Projevem onemocnění byly proužkovité gonády spojené s předčasným ovariálním selháním. Podobně byly identifikovány i jiné mutace genu BMP-15. Na rozdíl od ojedinělých případů mutací genu GDF-9 spojených s vícečetnou ovulací se u mutací genu BMP-15 tato neprokázala [64].

Indukce ovulace

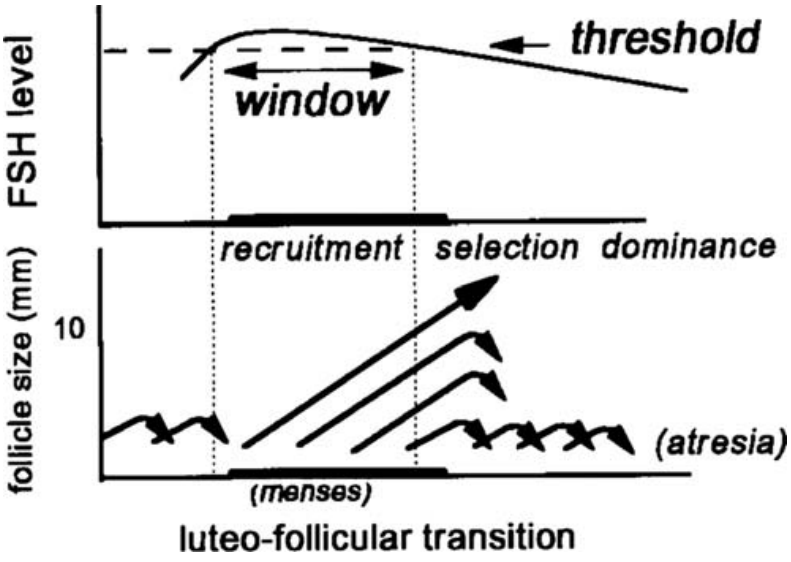
„FSH threshold“

Použití nízkých dávek gonadotropinů je založeno na koncepci dosažení *„FSH threshold“* [34, 80]. Pojmem „FSH threshold“ autoři rozumí individuální denní dávku gonadotropinů, která zajistí růst folikulu. Předpokládá se, že mírné zvýšení plasmatické koncentrace FSH (10-30 % nad hranici „FSH threshold“) je dostatečné pro správný vývoj pouze jednoho folikulu, kdežto další zvýšení již vede k nadměrné ovariální odpovědi s multi-folikulárním vývojem.

„FSH window“

Pojmem „FSH window“ Macklon označuje dobu, kdy je koncentrace FSH nad úrovní „FSH threshold“ [69]. Tato doba se jeví zásadní pro selekci jen jednoho dominantního folikulu ze skupiny antrálních folikulů. Čím je delší doba koncentrace FSH nad úrovní „FSH threshold“ a tím delší „FSH window“, tím můžeme získat větší počet rostoucích folikulů u zdravé mladé ženy s přiměřenou ovariální rezervou.

Obr. č. 11 „FSH threshold“ a „FSH window“



Převzato z [70].

Klomifencitrát

Klomifencitrát je již po 50 let základním přípravkem v indukci ovulace [45, 81]. Klomifencitrát byl syntetizován v roce 1956, v roce 1967 byl s chválen pro léčbu anovulační neplodnosti WHO typ II v USA.

Jde o směs 2 isomerů: enklomifen a zuklomifen [82].

Klomifencitrát patří mezi SERM molekuly (Selective Estrogen Receptor Modulator), tedy selektivní modulátory estrogenových receptorů. Ačkoliv není steroid, působí na estrogenové receptory.

V centrálním nervovém systému (*hypotalamus, hypofýza*) kompetitivně obsadí estrogenové receptory (blokuje jejich aktivaci) a současně snižuje jejich počet [83]. Blokádou negativní estrogenní zpětné vazby stimuluje sekreci GnRH a zvyšuje sensitivitu hypofýzy k GnRH.

Podání klomifencitrátu je po krátkém zpoždění následováno uvolněním gonadotropinů (FSH i LH) z hypofýzy a vede k náboru folikulů, selekci, podpoře dominance folikulů a uvolnění vajíčka.

Skutečnost, že klomifencitrát obsadí hypotalamické estrogenové receptory na delší dobu než estrogeny, může vést ke zvýšení amplitudy LH pulsů v hypotalamu a k dalšímu zvýšení sekrece LH z hypofýzy v luteální fázi. V současnosti se vedou diskuze [84], zda toto zjištění má klinický dopad na ženy s prokázanou normální ovulací (idiopatický faktor neplodnosti nebo mírný andrologický faktor) a jaký další klinický dopad má toto zjištění u žen s anovulací charakterizovanou vyšším poměrem LH/FSH.

Doporučená dávka klomifencitrátu je od 50 mg do 150 mg (1- 3 tablety) denně.

Indikací podání klomifencitrátu je normogonadotropní anovulace, tedy léčba žen s nepravidelnou menstruací typu oligomenorhea, které příznivě reagují na terapeutické podání progestinů (progesteronový test), příp. idiopatická neplodnost.

Kontraindikací je těhotenství, ovariální cysta, krvácení neznámého původu a přecitlivělost na složku léku.

Po podání klomifencitrátu prokazujeme *ovulaci* u 80- 90 % žen, těhotenství je dosaženo po 3- 6 měsících používání u 30 % žen.

Příčiny nedosažení těhotenství po podání klomifencitrátu [83]:

- Antiestrogenní efekt na endometrium (vazba na estrogenové receptory *endometria* bývá příčinou nižší výšky sliznice)
- Antiestrogenní efekt na hlen hrdla děložního
- Účinek na tubární transport
- Účinek na kvalitu oocytů
- Porucha luteální fáze (porucha funkce žlutého tělíska)

Prokázané *vedlejší účinky* [82]:

- Návaly horka
- Suchost sliznic
- Bolesti hlavy
- Poruchy zraku
- Vznik funkční ovariální cysty

Gonadotropiny

Jak bylo ř ečeno dříve, jde o skupinu glykoproteinů se specifickým účinkem na ovárium.

Vazbou na specifické receptory *ovária* vedou podobně jako klomifencitrát k náboru folikulů, selekci, podpoře dominance folikulů a uvolnění vajíčka.

Indikace podání gonadotropinů:

- Léčba anovulace společně s intrauterinní inseminací
- Nedosažení těhotenství při opakovaných podání klomifencitrátu s prokázanou ovulací [85]
- Klomifencitrátová rezistence (anovulace nereagující na léčbu klomifencitrátem) [86]

Kontraindikací je těhotenství, ovariální cysta, krvácení neznámého původu a přecitlivělost na složku léku.

Technologie výroby lidských gonadotropinů:

- Moč postmenopauzálních žen
- Rekombinantní technologie

Technologie výroby gonadotropinů z *moči* byla spojena s potřebou velmi vysokého objemu moči postmenopauzálních žen, s rizikem kontaminace a současně s rizikem různé biologické aktivity (batch-to-batch) [87, 88]. Rozdíly mezi jednotlivými šaržemi urinárních přípravků byly velmi velké a mohly vést ve 30 % cyklů k velmi nízké, případně nadměrné ovariální odpovědi.

Čištěné urinární gonadotropiny vznikají oddělením nepotřebných proteinů než jsou aktivní FSH a LH.

Právě *rekombinantní technologie* (transfer non-humánních buněčných linií ovariálních buněk čínského křečíka- Chinese hamster ovary cells) zajistila dostatečné množství účinného, spolehlivého a bezpečného lidského gonadotropinu s možností přesného dávkování. Studie prokázaly bezpečnost, dobrou toleranci a vysokou účinnost rekombinantních přípravků v porovnání s urinárními [66, 82, 89].

Porovnání obsahu FSH a LH v gonadotropinech přináší tabulka 1:

Tabulka 1: Porovnání obsahu FSH a LH v gonadotropinech

Název	**Technologie výroby**	**Poměr FSH/LH**
Menotropin (Metrodin)	Urinární	75:75
Urofollitropin (Metrodin- HP)	Urinární čištěný	75:1
Follitropin alfa	Rekombinantní	Pouze FSH
Follitropin beta	Rekombinantní	Pouze FSH

Způsoby podání gonadotropinů:

- Standardně smícháním prášku se sterilní vodou u urinárních přípravků
- Aplikační pero přednaplněné roztokem gonadotropinu u rekombinantních přípravků

Možnosti dávkování gonadotropinů dle způsobu vzniku:

- 75 IU u urinárních přípravků (1 ampule)
- 25 IU, příp. 37.5 IU u rekombinantních přípravků

Určení adekvátní dávky gonadotropinů

Pro určení adekvátní dávky gonadotropinů používáme znalost:

- Anamnestické odpovědi vaječníků na indukci ovulace, znalost nadměrné ovariální odpovědi
- Věk ženy
- Body mass index (BMI)
- Určení ovariální rezervy a očekávané ovariální odpovědi
- Typ gonadotropinů, rekombinantní nebo urinární

Ovariální rezerva

Ovariální rezervou pro potřeby indukce ovulace rozumíme znalost předpokládaného počtu folikulů a pro potřeby mimotělního oplodnění rozumíme odhad zásoby vajíček dostupných ve vaječníku, jinými slovy reprodukční potenciál [90].

Význam vyšetřování ovariální rezervy:

- Predikce nízké ovariální odpovědi
- Predikce nadměrné ovariální odpovědi
- Predikce ovariální odpovědi po chirurgických výkonech, léčbě malignit
- Predikce dosažení těhotenství, porodu

K vyšetřování ovariální rezervy je možné použít následující parametry a testy:

- Folikulostimulační hormon (FSH) v den 3 menstruačního cyklu
- E2 v den 3 menstruačního cyklu
- Progesteron v den 3 menstruačního cyklu
- Anti-Mulleriánský hormon (AMH)
- Inhibin-B v den 3 menstruačního cyklu
- Počet antrálních folikulů (Antral follicle count- AFC) počet folikulů 2-5 mm v průměru
- Vaskularita a objem vaječníků
- Clomifen Citrate Challenge Test (CCCT), Gonadotropin-releasing hormone Agonist Stimulation Test (GAST), EFORT

Testy je možné rozdělit na pasivní (FSH, AMH, AFC, vaskularita vaječníků a objem vaječníků) a dynamické (CCCT, GAST a EFORT) [91].

Folikulostimulační hormon

Hladina FSH je regulovaná negativním feedbackem granulózových buněk a proto ne úplně přesně odráží počet antrálních folikulů [92]. Zvýšená koncentrace FSH je kompenzace hypofýzy pro starší a méně citlivé vaječníky [91].

Studie Hansen [93] z roku 1996 sledovala koncentraci FSH a estradiolu u 44 žen v 66 cyklech. Práce prokázala *nevýznamné změny v koncentraci FSH při odběru v den 2, 3,*

4 a 5 menstruačního cyklu. Práce potvrdila korelaci mezi věkem a koncentrací FSH, se stoupajícím věkem stoupá i koncentrace FSH.

Hodnota FSH prokázaná v den 2 nebo 3 menstruačního cyklu je i přes *intraindividuální variability v různých cyklech* významná [91]. Časté je kolísání hladin FSH mezi cykly, zvláště u koncentrací FSH ≥ 15 IU/l [94]. Protože koncentrace FSH odráží reprodukční potenciál konkrétního menstruačního cyklu, při vyšší hodnotě FSH se doporučuje odklad léčby o měsíc a opět kontrolu FSH v den 2 následujícího menstruačního cyklu. Jakmile koncentrace FSH začne být kolísavá, jde již o projev snížené ovariální rezervy. Normální hodnota FSH je do 10 IU/l, mírně zvýšená hodnota 10-12 IU/l. Hraniční hodnota FSH je 12 IU/l. S FSH < 15 IU/l je pravděpodobnost otěhotnění 2x větší než ve skupině 15 až 24,9 IU/l [91]. Metaanalýza testů ovariální rezervy Broekmana [95] shrnuje, že pro předpověd nízké ovariální odpovědi a neotěhotnění jsou významné pouze vysoké koncentrace FSH.

Hladina estradiolu

Koncentrace estradiolu v den 3 den menstruačního cyklu může doplnit informace o ovariální aktivitě. Vysoká hodnota E2 > 80 pg/ml naznačuje nerovnoměrný vývoj folikulů nebo skutečnost, že fáze získání dominantního folikulu je ukončena [93]. U pacientek léčených v programu mimotělního oplodnění bylo u těchto hodnot estradiolu prokázáno vyšší riziko zastavení cyklů pro nízkou odpověď a nízká pravděpodobnost dosažení těhotenství [91]. Nízká hodnota E2 < 80 pg/ml zvláště s normální hladinou FSH bývá spojena s dobrou ovariální odpovědí a dobrou prognózu úspěšné léčby.

Hladina progesteronu

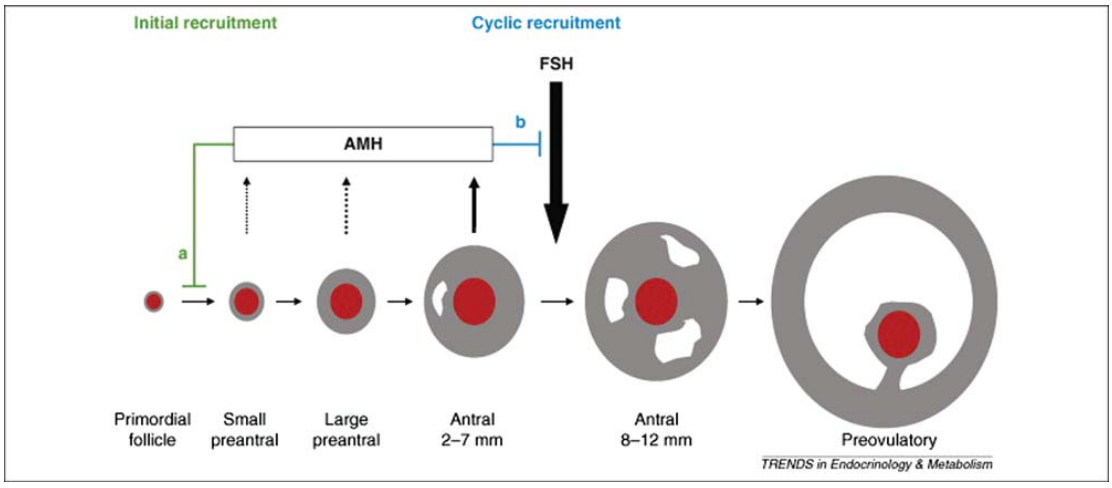
Byl zjišťován význam koncentrace progesteronu v den 3 menstruačního cyklu pro průkaz snížené ovariální rezervy ve spojení se zkrácení folikulární fáze, časného LH vrcholu nebo předčasného zvýšení progesteronu. Predikce ovariální rezervy založená na znalosti hladiny progesteronu nebyla podpořena review Sillse [91].

Anti-Mülleriánský hormon

Anti-Müllerianský hormon (nazývaný též Müllerian inhibiting substance) je glykoprotein, který je součástí rodiny růstových faktorů TGF-β.

Je syntetizován Sertoriho buňkami fetálních varlat a granulozóvými buňkami preantrálních a malých antrálních folikulů ovárií [96]. Produkce AMH ustává v době selekce dominantního folikulu a v průběhu procesu atrézie folikulu. Ve studiích na kultivovaných lidských granulozových buňkách nebylo prokázáno přímé působení FSH na expresi mRNA anti-Müllerianského hormonu při ovariální stimulaci gonadotropiny [92]. AMH působí na specifické receptory typu I a II [77]. Hlavní účinek AMH je v navození regrese Mülleriánských vývodů během vývoje mužských pohlavních orgánů, které se jinak diferencují v dělohu a vejcovody. U ženy je AMH koordinační faktor ve folikulogenezi: inhibuje nábor primordiálních folikulů do skupiny rostoucích folikulů a snižuje senzitivitu rostoucích preantrálních a antrálních folikulů na FSH [79], účastní se selekce dominantního folikulu [97].

Obr. č. 12 Mechanismus účinku AMH

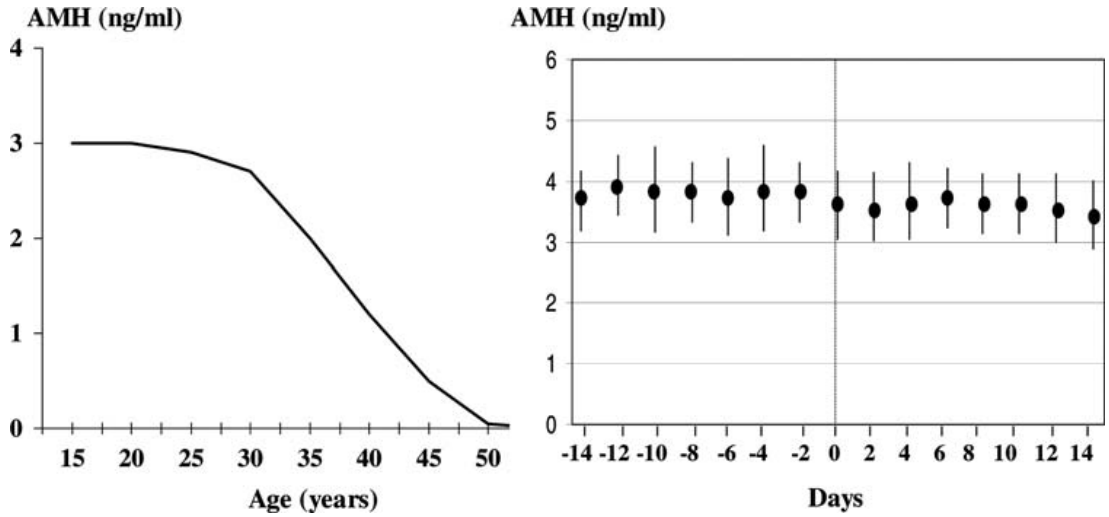


Převzato z [98].

Na transgenních myších modelech s nadměrnou expresí AMH autoři prokázali, že ve fetálním období má vysoká hodnota AMH negativní vliv na vývoj vaječníků, myši byly neplodné a současně měly slepě končící pochvu společně s nepřítomností dělohy a vejcovodu. V dospělém období pod vlivem nadměrné exprese AMH ovária degenerují. Fyziologické hladiny AMH mají u myší vliv na vývoj zárodečných buněk [79].

Hladina AMH v séru odráží *počet preantrálních folikulů*, které hormon produkují [99]. *V průběhu menstruačního cyklu se hladina AMH nemění*, lze jej odebírat kdykoli v průběhu cyklu. Fyziologické hladiny AMH jsou 1.0-5.0 pmol/l (ve starších jednotkách ng/ml).

Obr. č. 13 Vliv věku a menstruačního cyklu na koncentraci AMH u mladých žen



Převzato z [98].

AMH < 1 pmol/l je spojen s malou ovariální rezervou [92]. Jiní autoři, např. Kunt [100] prokázali cut-off koncentraci AMH 2.96 ng/ml pro predikci nízké ovariální odpovědi se senzitivitou 100 % a specificitou 89 %. Metaanalýza testů ovariální rezervy Broekmana [95] shrnula pro AMH sensitivitu 75 % a specificitu 85 %. Broer shledal *korelaci mezi nízkými koncentracemi AMH a nízkým AFC* [101]. AMH prokázaný v den 3 menstruačního cyklu je lepší predikční faktor než věk a FSH [96]. AMH > 5 pmol/l byl prokázán u PCO syndromu a predikuje vyšší ovariální rezervu. V souhrnu je AMH výhodné použít k určení jak ovariální rezervy, tak ovariální odpovědi v průběhu indukce ovulace. Autoři se shodují, že znalost AMH je výhodné kombinovat s dalšími testy, především s AFC [102], dále s FSH a estradiolem.

Jsou pozorování, že laboratorní postupy k určení AMH nejsou ve světě stále standardizovány [103].

V pochopení působení AMH stále zůstává řada otázek, např. zda folikuly menší než 2 mm neprodukují také AMH, jakým způsobem je u PCO syndromu při vysokých hodnotách AMH ř ízeno získání a rozvoj většího počtu folikulů v porovnání se zdravými ženami.

Hladina inhibinu-B

Metaanalýza testů ovariální rezervy Broekmana [104] shrnuje, že uplatnění inhibinu-B pro předpověď nízké ovariální rezervy a neotěhotnění je u žen s pravidelným menstruačním cyklem omezené.

Počet antrálních folikulů

AFC (Antral Follicle Count) rozumíme počet drobných folikulů 2-5 mm v den 1 nebo 2 menstruačního cyklu zjištěný ultrazvukovým vyšetřením [105].

Obr. č. 14 Ultrazvukový obraz antrálních folikulů pro měření AFC

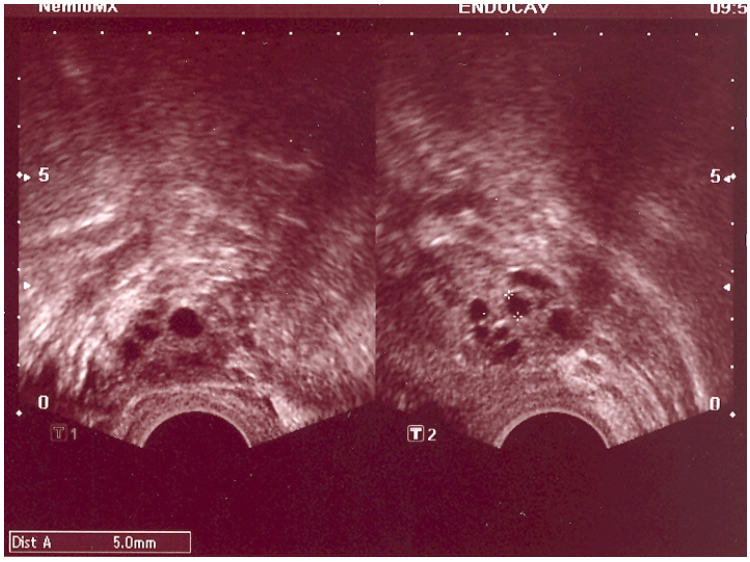


Foto archiv autora.

Problémem jsou inter-individuální odlišnosti ve způsobu měření [91].

Interpretace AFC: AFC < 5 je spojen s malou ovariální rezervou, AMH > 15 byl prokázán u syndromu polycystických ovárií a predikuje vyšší ovariální rezervu (i vyšší ovariální odpověď). AFC není úspěšný v predikci dosažení těhotenství [91]. Metaanalýza testů ovariální rezervy Broekmana [95] shrnuje, že je AFC test pro identifikaci žen s nízkou ovariální rezervou.

Vaskularita a objem vaječníků

Díky zavedení transvaginální pulsní Dopplerovské ultrazvukové techniky byl průtok krve hodnocen v přirozeném i stimulovaném cyklu. Ojediněle byla pozorována negativní korelace mezi věkem a průtokem krve ve vaječníku. Predikce ovariální rezervy založená na obou zmíněných postupech se prakticky nepoužívá [91].

Dynamické testy ovariální rezervy (CCCT, GAST a EFORT)

Clomifen Citrate Challenge Test- CCCT byl dynamický test založený na podání klomifencitrátu. Test byl poprvé byl popsán Navotem v roce 1987 [106].

Hodnotilo se FSH, LH a E2 v den 2-3 menstruačního cyklu, a dále v den 9- 11 po podání 2x50 mg klomifencitrátu denně 5.- 9. den cyklu. [91]. Autor u 18 žen z 51 s idiopatickým faktorem neplodnosti s normálními bazálními hladinami FSH prokázal zvýšení FSH nad 26 mIU/ml. Ve druhé skupině tvořené 33 ženami s adekvátní odpovědí bylo FSH 11.5 mIU/ml. V první skupině se sníženou ovariální rezervou otěhotněla pouze 1 žena z 18 (5 %) a ve druhé skupině 14 žen z 33 (42 %). Tento statisticky významný výsledek ($p < 0.05$) vedl k závěru, že navzdory zdánlivě normálně probíhajícím ovulačním cyklům v první skupině je folikulogeneza inadekvátní. Zvýšení koncentrace FSH v průběhu testu autor vysvětlil nesouladem mezi normální funkcí granulózových buněk produkovat estradiol a sníženou schopností sekrece inhibinu.

Abnormální výsledek CCCT byl vysoce prediktivní pro snížení ovariální rezervy v přirozených cyklech, v průběhu indukce ovulace a IVF. Např. Loumaye [107] hodnocením výsledků u 114 žen zaznamenal u 26 těhotných žen hranici 26.03 mIU/mL. U 20 pacientek s prokázaným abnormálním výsledkem testu pozoroval vyšší spotřebu gonadotropinů a cyklus byl zrušen ve 25 % pro nízkou ovariální odpověď (v porovnání 1 % v kontrolní skupině).

Jiní autoři popsali test jako lepší než samotný FSH, ale u žen nad 40 let je málo prediktivní v odpovědi na stimulaci a dosažení těhotenství. Současně CCCT projevoval výrazné variabilitu mezi cykly [94].

Dále např. metaanalýza 12 studií Broekmanse [95] hodnotila tento test. Přestože klomifencitrátový test dosáhl sensitivity 75 % a specificity 85 %, jeho uplatnění není výhodnější než kombinace znalostí AFC a FSH. Z tohoto důvodu jej [91] nedoporučuje používat jako test první volby.

Fyziologická odpověď na aplikaci gonadotropin- releasing hormon agonisty (GnRH-a) zahrnovala iniciální vzestup estradiolu („flare up“ fenomén) následovaný útlumem estradiolu. ***GnRH-a test (GAST)*** popsal Winslow v roce 1993 [108]. Pokud vzestup E2 po aplikaci GnRH analoga nebyl prokázán, šlo o snížení ovariální rezervy. Metaanalýza Sillse [91] identifikovala pouze 3 studie hodnotící GAST.

Exogenní FSH test byl dalším dynamickým testem ovariální rezervy (***Exogenous FSH ovarian reserve test- EFORT***). Fanchin [109] hodnotil bazální koncentrace FSH a E2 následované aplikací gonadotropinu a kontrolním odběrem E2.

Dynamické testy se dnes již v praxi nepoužívají.

Experimentální postupy k vyšetření ovariální rezervy:

- Průkaz změn genové exprese granulózových a kumulárních buněk
- Konfigurace FSH receptoru

Průkaz změn genové exprese granulózových a kumulárních buněk

Skiadas [110] popsal profil genové exprese buňkách granulózy ve skupině mladých žen (n= 13) se sníženou ovariální rezervou a tyto výsledky porovnal s výsledky stejně starých zdravých žen v programu darování vajíček (n= 13). Autor získal granulózové buňky, extrahoval RNA a provedl microarray analýzu pro zhodnocení genetických rozdílů mezi skupinami. Kontrolní vyšetření bylo realizováno metodou PCR.

Skiadas prokázal výrazné rozdíly mezi sledovanými skupinami:

- Průměrná exprese AMH byla významně vyšší u dárkyň vajíček
- Průměrná exprese genu *LH receptoru* (*LHCGR*) byla významně vyšší u žen se sníženou ovariální rezervou

Autoři konstatovali, že analýza genové exprese granulózových buněk je přínosná v určení snížené ovariální rezervy.

Současná studie Greenselda [111] analýzou 1256 genů granulózových buněk zaznamenala downregulaci genu *IGF* u žen s prokázanou sníženou ovariální rezervou.

Další současná studie Jindala [112] prokázala změnu exprese genu gremlin 1 (*GREM1*) v kumulárních buňkách mladých žen se sníženou ovariální rezervou.

Konfigurace FSH receptoru

Bosch [113] nově nabízí myšlenku uplatnění hodnocení ovariální rezervy díky znalosti ***genetické konfigurace FSH receptoru*****, případně společně** s biomarkery (AMH). V budoucnu by farmakogenetika mohla vyšetřovat genovou expresi a nukleotidový polymorfismus FSH receptorů pro určení optimální dávky gonadotropinů dle pacientova genotypu.

Adekvátní počáteční dávku gonadotropinů stanovujeme na základě znalosti výše uvedených faktorů. V současnosti používáme typický nízkodávkovací step-up protokol s počáteční dávkou 50- 75 IU rekombinantních gonadotropinů nebo 75 IU urinárních gonadotropinů na 7- 14 dní.

Ultrazvukové vyšetření v den 8 nebo 9 menstruačního cyklu hodnotí skutečnou ovariální odpověď. V případě nízké ovariální odpovědi na podané počáteční dávky gonadotropinů je nezbytné *denní dávku zvýšit* o 25 IU, 37.5 IU nebo 50 IU denně [114].

Hugues konstatuje [115], ***že určení správné počáteční dávky FSH a způsobu následné úpravy dávky jsou zásadní kroky v minimalizaci rizika nadměrné ovariální odpovědi*** ("the choice of the FSH starting dose and the modality of subsequent dose adjustments are critical in controlling the risk of overstimulation").

Choriový gonadotropin pro konečnou maturaci oocytů

Aplikace lidského choriového gonadotropinu (HCG) je nejčastější ukončení kontrolované ovariální hyperstimulace [116].

hCG díky své struktuře (lidský choriový gonadotropin a luteinizační hormon mají podobnou molekulární strukturu a ve více než 80 % jsou homologní) obsadí vazebná místa na LH receptoru folikulu, vede k biologickému účinku a ke konečnému dozrání vajíček.

Aplikace hCG je charakterizována delším biologickým poločasem hormonu (> 24 hod versus 60 min pro LH), pevnější a delší vazbou na granulózové buňky folikulů oproti endogennímu ovulačnímu LH vrcholu [117].

Takto navozený dlouhotrvající luteotropní efekt (vývoj mnohočetných žlutých tělísek a dosažení vysokých hladin estradiolu a progesteronu) dále vede k uvolnění mediátorů (např. VEGF, IL-2 apod.) a ke komplexnímu účinku na organismus (např. zvýšení permeability cév apod.), který může být příčinou rozvoje OHSS.

Intrauterinní inseminace

Intrauterinní inseminace je postup, při kterém zavádíme spermie do dutiny děložní jiným způsobem, než pohlavním stykem.

Historicky první popsané provedení inseminace lidskými spermiemi náleží skotskému chirurgovi Johnu Hunterovi, který v roce 1770 údajně úspěšně použil teplou stříkačku naplněnou spermatem. Indikací byla hypospádie muže [118]. V roce 1884 americký lékař William Pancoast prvně zavedl čerstvé spermie dárce ženě v celkové anestézii. Žena následně porodila. První těhotenství po intrauterinní inseminaci se zmraženými spermiemi dárce popsal Bunge a Sherman v roce 1953.

Nástrojem k provedení výkonu je tenký, ohebný, plastový katétr. Dříve používaná cervikální inseminace se dnes již nepoužívá a byla zcela nahrazena více úspěšným postupem inseminací intrauterinní [119].

Metoda je jednoduchá, šetrná a současně finančně nenáročná [31].

Cíle intrauterinní inseminace jsou:

- Náhrada pochvy a hrdla děložního v procesu reprodukce
- Kapacitace spermií pomocí laboratorní přípravy
- Zavedení spermií co nejblíže vajíčku
- Zavedení spermií v době uvolnění vajíčka (ovulace)

Indikace intrauterinní inseminace s použitím spermiemi partnera:

- Idiopatická neplodnost
- Anovulace
- Mírný andrologický faktor (koncentrace spermií < 5 mil/ml)
- Ostatní indikace např. urologické (např. hypospádie, retrográdní ejakulace)
- Indikace sexuologické (např. vaginismus, erektilní dysfunkce, syndrom předčasné ejakulace aj.)
- Imunologický faktor spojený např. s průkazem protilátek proti spermiím (anti sperm antibodies- ASA) u ženy

Indikace intrauterinní inseminace s použitím spermiemi anonymního dárce:

- azoospermie bez zisku spermií po provedené mikrochirurgické operaci
- prevence genetických onemocnění

Kontraindikace intrauterinní inseminace společně s indukcí ovulace:

- Absolutní tubární faktor neplodnosti
- Závažný andrologický faktor neplodnosti
- Těhotenství, laktace
- Ovariální cysta
- Gynekologické krvácení nejasné etiologie
- Karcinom vaječníků, dělohy nebo prsu, nádor hypothalamu a hypofýzy
- Stavy, kdy nelze předpokládat účinnou odpověď (např. ovariální selhání, malformace pohlavních orgánů neslučitelná s těhotenstvím, děložní myomy)
- Takový zdravotní stav, kde případné těhotenství může ohrozit zdraví a život ženy

Postup *přípravy spermií metodou swim-up určuje manuál WHO* [120].

Metody intrauterinní inseminace spermiemi manžela i dárce jsou prováděny na základě současných platných zákonů a vyhlášek. Jedná se Zákon č.296/2008 Sb. O zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka (zákon o lidských tkání a buňkách) společně s Vyhláškou č. 422/2008 Sb. O stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka.

Intrauterinní inseminace je doporučována jako léčba první volby pro páry s idiopatickou neplodností [121] ***nebo mírným andrologickým faktorem*** [31].

Zeyneloglu [121] již v roce 1998 popsal 49 těhotenství u 431 cyklů časovaného styku (těhotenský index 11 %) versus 110 těhotenství u 549 cyklů intrauterinní inseminace (těhotenský index 20 %). V této metaanalýze randomizovaných studií z celkového počtu 980 cyklů Zeyneloglu shrnul, že intrauterinní inseminace nabízí vyšší pravděpodobnost otěhotnění v porovnání s časovaným stykem (timed intercourse).

Práce Khalila [31] hodnotila prognostické faktory u 2473 léčebných cyklů intrauterinních inseminací se spermiemi manžela. Khalil popsal těhotenský index na cyklus 8.7 % v roce 1990 až 14.8 % v roce 1998. Pravděpodobnost porodu plodu byla 27 % po průměrně 2.8 cyklech intrauterinních inseminací.

Costello [122]v metaanalýze 6 randomizovaných studií v roce 2004 také prokázal zvýšení těhotenského indexu při indukci ovulace *klomifencitrátem* společně s intrauterinní inseminací versus nativní cykly s časovaným stykem.

Faktory, které ovlivňují úspěšnost intrauterinní inseminace

Věk ženy

V letech 1973 až 1980 Schwartz ve francouzské studii CECOS sledoval 2193 žen a prokázal na *modelu intrauterinních inseminacích s dárcem spermií* významné snížení pravděpodobnosti dosažení těhotenství u žen nad 30 let. Popsal těhotenský index na cyklus 10.5 % u žen 26- 30 let, 9.1 % u žen 31-35 let a 6.5 % u žen > 35 let. Kumulativní úspěšnost při realizaci 12 cyklů klesla z 74 % u žen mladších 30 let, přes 61 % u žen 26- 30 let na 54 % u žen starších 35 let [123].

Plosker [124] po analýze 381 cyklů intrauterinní inseminace popsal výrazné snížení fekundity (synonymum pro fertilitu) na cyklus 0.11- 0.14 ve věkové skupině 25- 39 roků v porovnání s 0.04 ve skupině nad 40 let.

Ve studii [125] Khalil retrospektivně analyzoval 1131 cyklů intrauterinních inseminacích také s darovanými spermiemi. Věk ženy pod 30 let byl spojen s nejvyšší pravděpodobností dosažení těhotenství.

Naopak pro ženy starší 40-ti let jsou výsledky intrauterinní inseminace méně příznivé. Práce Perlstona [126] hodnotila 402 cyklů intrauterinní inseminace u 85 žen této věkové kategorie. Práce prokázala těhotenský index 3.5 % na cyklus a pravděpodobnost porodu živého plodu dokonce jen 1.2 % na cyklus!

Faktor neplodnosti

V léčbě idiopatické neplodnosti a v léčbě anovulace intrauterinní inseminace nabízí nejvyšší očekávanou pravděpodobnost dosažení těhotenství. Poruchy funkce vejcovodu, endometrióza apod. očekávanou úspěšnost snižují.

Koncentrace spermií

Khalil [31] popsal *koncentraci 5 mil/ml spermií* pro úspěšnou realizaci intrauterinní inseminace. Výsledky prokázaly, že při průkazu koncentrace spermií < 5 mil/ml, je vhodné párům nabídnout metody asistované reprodukce (mimotělní oplodnění- in vitro fertilizace- IVF nebo intracytoplasmatická injekce spermie do vajíčka- ICSI).

Výběr protokolu mezi nativním cyklem, indukcí ovulace klomifencitrátem nebo gonadotropiny

Jak bude uvedeno níže indukce ovulace, především gonadotropiny, zvyšuje pravděpodobnost otěhotnění.

Počet folikulů

Již studie Ploskera z roku 1994 prokázala výrazné zvýšení pravděpodobnosti dosažení těhotenství počtu folikulů 2 v porovnání s folikulem 1.

Výše zmíněná práce Khalila [125] také pozorovala, že se vzrůstajícím počtem folikulů stoupá pravděpodobnost dosažení těhotenství, ale počet folikulů > 3 byl spojen s nepřijatelným rizikem vícečetného těhotenství, zde 20.6 %.

Tato pozorování potvrdila metaanalýza van Rumsteho [30], která shrnula že multi-folikulární vývoj je spojen s vyšším těhotenským indexem. Cykly s 3 a 4 folikuly již nevedly ke zvýšení pravděpodobnosti dosažení těhotenství, jen přispěly k dosažení vícečetných těhotenství.

Intracervikální versus intrauterinní inseminace

Již v roce 1999 publikovaná randomizovaná studie Guzicka [41]hodnotila těhotenský index ve skupinách nativní cyklus + intracervikální inseminace, nativní cyklus+intrauterinní inseminace, indukce ovulace+ intracervikální inseminace a indukce ovulace+intrauterinní inseminace. Těhotenský index na pár byl 10 %, 18 %,

19 % a 33 %, resp. Studie jednoznačně prokázala, že intrauterinní inseminace zvyšuje těhotenský index v porovnání s inseminací intracervikální 3.2 krát.

Podpora luteální fáze

Progesteron produkovaný žlutým tělískem je nezbytný pro implantaci a udržení počínajího těhotenství. Bylo prokázáno, že progesteron zvyšuje receptivitu endometria indukcí sekreční změn v luteální fázi [84]. Existuje obava, že suprafyziologické koncentrace estrogenů a progesteronu v časné luteální fázi mohou negativní zpětnou vazbou utlumit hypotalamo- hypofyzární osu a takto snížit sekreci LH, důležitého pro další tvorbu progesteronu. Tato obava z nedostatečné funkce žlutého tělíska, zvláště v cyklech indukce ovulace klomifencitrátem nebo gonadotropiny, vedla k uplatnění přírodních gestagenů. Přírodní gestageny jsou charakteristické vyloučením nadbytečného hormonu močí. Takto jejich použití v podpoře luteální fáze nemusí být doprovázeno kontrolami sérových hladin progesteronu nebo progesteronu v moči, jak bylo zvykem dříve. Podpora luteální fáze mikronizovaným progesteronem se v současnosti běžně používá ke zvýšení těhotenského indexu.

V současné randomizované studii Agha-Hosseini [127] sledoval 290 žen s idiopatickou neplodností a mírným andrologickým faktorem a luteální fázi podpořil mikronizovaným progesteronem jedenkrát denně od následujícího dne po provedení inseminace do 12. týdne těhotenství. Autor dosáhl klinického těhotenského indexu 24.3 % vs. 14.1 % ve skupinách s podporou luteální fáze vs. bez podpory. Autoři prokázali, že podání mikronizovaného progesteronu zvyšuje těhotenský index.

Důležitou skutečností je i způsob podání progesteronu. Ovlivňuje totiž plasmatické hladiny progesteronu i případné vedlejší nežádoucí účinky [128].

Způsoby podání mikronizovaného progesteronu:

- Perorální podání
- Intramuskulární aplikace
- Vaginální podání

Perorální podání mikronizovaného progesteronu je spojeno s průkazem nižších sérových hladin progesteronu v porovnání s podáním intramuskulárním nebo vaginálním, jak ukázaly randomizované studie. Důvodem je především individuální metabolismus progesteronu v játrech. Studie dále prokázaly nižší pravděpodobnost implantace, nižší pravděpodobnost otěhotnění a vyšší riziko potratu. Problémem mohou být metabolity, které navozují somnolenci. Takto snaha zvýšit perorální dávku mikronizovaného progesteronu naráží na nepřijatelné riziko vedlejších účinků, především sedace.

Intramuskulární aplikace progesteronu v oleji byla dříve často používaným postupem. Tento přístup zajistil koncentraci progesteronu v séru nad fyziologickou hranicí. Byl také prokazatelně spojen s příznivou přeměnou endometria a příznivou pravděpodobností dosažení těhotenství. Přesto intramuskulární aplikace není komfortní pro pacientky a může způsobit vedlejší účinky, např. poranění nervu, alergickou reakci nebo reakci v místě aplikace.

Vaginální podání mikronizovaného progesteronu nabízí pro pacienta výhody šetrnosti a vysoké tolerance. Studie potvrdily, že vaginální podání mikronizovaného progesteronu je nejméně tak účinné jako intramuskulární aplikace a více účinné než perorální podání při hodnocení histologie endometria a pravděpodobnosti otěhotnění. Koncepce „first uterine pass effect“ hovoří o skutečnosti, že mikronizovaný progesteron po vaginálním podání přímo působí na dělohu.

Mechanismy působení „first uterine pass effect“:

- Pasivní difůze mikronizovaného progesteronu
- Transport cervikálním kanálem
- Transport venózní a lymfatickou cirkulací

Výsledky studií potvrzují vysoké koncentrace mikronizovaného progesteronu v děložní sliznici a je spojena s příznivou synchronní transformací endometria, napodobující více fyziologickou transformaci, než po intramuskulárním podání. Je možné zvolit mikronizovaný progesteron ve formě tablet nebo gelu [128].

Počet cyklů intrauterinní inseminace

Autoři doporučují realizaci 3-6 cyklů intrauterinní inseminace.

Plosker popsal dosažení těhotenství především v prvních třech cyklech intrauterinní inseminace [124].

Khalil [125] dále prokázal, že realizace více než 6 cyklů intrauterinní inseminace již jen málo zvyšuje kumulativní těhotenský index. Jinými slovy realizace sedmého a dalšího cyklu intrauterinní inseminace jen zřídka kdy vede k dosažení těhotenství.

Mezi faktory, které můžeme ovlivnit, patří především bod 5- ***výběr stimulačního protokolu mezi nativním cyklem, indukcí ovulace klomifencitrátem nebo gonadotropiny.***

Pro páry s idiopatickým faktorem neplodnosti je prokázaná pravděpodobnost dosažení těhotenství v *přirozených (nativních)* cyklech společně s intrauterinní inseminací jen 5-6 % [129, 130].

Studie Arici [104] prokázala zvýšení těhotenského indexu při indukci ovulace *klomifencitrátem* společně s intrauterinní inseminací v porovnání s nativními cykly společně s intrauterinní inseminací. Ve skupině s podáním klomifencitrátu, indukcí ovulace choriovým gonadotropinem a intrauterinní inseminací autoři popsali 6 těhotenství z 23 cyklů (těhotenský index 26 % na cyklus) vs. skupina v nativním cyklu s intrauterinní inseminací časovanou dle LH vrcholu, kde autoři zaznamenali pouze 1 těhotenství z 20 cyklů (těhotenský index 5 % na cyklus).

Klomifencitrát společně s intrauterinní inseminací je proto doporučován jako počáteční léčba pro páry s idiopatickým faktorem neplodnosti, s mírným andrologickým faktorem a anovulací [42, 45].

Tento postup zajišťuje dosažení ovulace u přibližně 70 % pacientů a pravděpodobnost dosažení těhotenství v 6 měsících je 35 % [81].

Srovnání použití klomifencitrátu a rekombinantních gonadotropinů (rFSH) společně s intrauterinní inseminací v randomizovaných studiích nabízí tabulka 2.

Tabulka 2. Randomizované studie – srovnání klomifencitrátu a rekombinantních gonadotropinů společně s intrauterinní inseminací.

Jméno autora	**Rok publikace**	**Počet žen v jednotlivých skupinách**	**Indikace**	**Výsledek**
Balasch [131]	1994	100 (50 mg CC vs. 75 IU rFSH)	Idiopatický, andrologický faktor	Těhotenský index 4 % vs. 13 %
Dankert [42]	2007	138 (71 žen 100 mg CC vs. 67 žen 75 IU rFSH)	Idiopatický faktor, mírný andrologický faktor	Kumulativní těhotenský index 38 % vs. 34.3 %
Berker [85]	2011	189 (93 žen 100 mg CC vs. 96 žen 75-100 IU rFSH)	Idiopatický faktor, mírný andrologický faktor	Těhotenský index 9.6 % vs. 15.6 %

Autoři v randomizovaných studiích prokázali, že rekombinantní gonadotropiny jsou minimálně stejně nebo více účinné v dosažení těhotenství u párů s idiopatickým faktorem a mírným andrologickým faktorem v porovnání léčbou klomifencitrátem.

Již v roce 1994 Balasch [131] popsal v randomizované studii těhotenský index 13 % ve skupině s aplikací 75 IU rekombinantních gonadotropinů versus 4 % ve skupině s podáním 50 mg klomifencitrátu.

Ve studii Dankert [42] randomizovaně srovnával počáteční dávku 100 mg klomifencitrátu s počáteční dávkou 75 IU rekombinantního gonadotropinu. *Poprvé bylo potvrzeno významné riziko nadměrné ovariální odpovědi při použití shodné počáteční dávky léčivých přípravků.* V této studii bylo celkem 35 cyklů v obou skupinách zrušeno pro nadměrnou ovariální odpověď (8.6 %)! Zastoupení

vícečetného těhotenství bylo vyšší ve skupině s klomifencitrátem (1 dvojčetné a 1 trojčetné těhotenství) v porovnání se skupinou rekombinantního FSH (1 dvojčetné těhotenství).

V současné randomizované studii Berker [85]sledoval 189 pacientek. Autor hodnotil 93 žen ve skupině s podáním 100 mg klomifencitrátu vs. 96 žen ve skupině aplikací 75-100 IU rekombinantního FSH. Multi-folikulární vývoj byl 35.1 % vs. 54.8 %, těhotenský index byl 9.6 % vs. 15.6 %. Autor shledal rekombinantní gonadotropiny výhodnější v zajištění multi-folikulárního vývoje oproti klomifencitrátu.

Srovnání urinárních (uFSH) a rekombinantních gonadotropinů (rFSH) v randomizovaných studiích indukce ovulace (bez intrauterinní inseminace) nabízí tabulka 3.

Tabulka 3. Randomizované studie – srovnání urinárních a rekombinantních gonadotropinů v indukci ovulace bez intrauterinní inseminace.

Jméno autora	**Rok publikace**	**Počet žen v jednotlivých skupinách**	**Indikace**	**Průkaz ovulace**
Bennink [132]	1998	172 (105 žen s rFSH vs. 67 žen s uFSH)	Anovulace s klomifencitrát rezistencí	69 % vs. 66 % cyklů
Yarali [133]	1999	50 (16 žen s rFSH vs. 35 žen s uFSH)	Anovulace s klomifencitrát rezistencí	93 % vs. 89 % cyklů
Platteau [46]	2006	184 (93 žen s rFSH vs. 91 žen s uFSH)	Anovulace s klomifencitrát rezistencí	85 % pro obě skupiny

Autoři v randomizovaných studiích prokázali, že rekombinantní gonadotropiny jsou minimálně stejně nebo více účinné v dosažení ovulace u žen s anovulací a klomifencitrát rezistencí v porovnání s urinárními přípravky.

Srovnání urinárních (uFSH), příp. vysoce čištěných urinárních (HP-hMG) a *rekombinantních gonadotropinů* (rFSH) v randomizovaných studiích kontrolované ovariální hyperstimulace společně s intrauterinní inseminací přibližuje tabulka 4.

Tabulka 4. Randomizované studie – indukce ovulace gonadotropiny společně s intrauterinní inseminací.

Jméno autora	**Rok publikace**	**Počet žen v jednotlivých skupinách**	**Indikace**	**Těhotenský index**
Gerli [134]	2004	138 (67 cyklů s uFSH vs. 71 cyklů s rFSH)	Idiopatický faktor, mírný andrologický faktor	Shodný
Demirol [135]	2007	241 (81 žen s rFSH, 80 žen s uFSH vs. 80 žen hMG)	Idiopatický faktor	25.9 % vs. 13.8 %
Sagnella [136]	2011	523 (262 žen s rFSH vs. 261 žen s HP-hMG)	Idiopatický faktor, mírný andrologický faktor	21.4 % vs. 19.7 %

Randomizované studie a metaanalýzy prokázaly vyšší nebo shodnou pravděpodobnost otěhotnění při použití rekombinantních gonadotropinů v porovnání s gonadotropiny urinárními. V souhrnu jsou rekombinantní gonadotropiny preferovány pro vyšší pravděpodobnost otěhotnění [137, 138].

Obava z aplikace vysokých dávek gonadotropinů, vysoké ovariální odpovědi, vícečetného těhotenství nebyla ve studiích s gonadotropiny dlouho vyjádřena. Ještě v roce 2003 Isaza [139] popsal v randomizovaném srovnání stimulací 100 IU rFSH a 150 IU uFSH. Autoři prokázali 2.9 vs. 3.7 folikulů (statisticky významné) a konstatovali, že denní dávka 100 IU rFSH denně je více účinná než 150 IU uFSH. Studie Isazi se soustředila na indukci ovulace, těhotenský index nebyl předmětem studie a proto studie není zařazena do tabulky 4.

Sagnella [136] v randomizovaném srovnání 262 žen s rekombinantním FSH vs. 261 žen s HP-hMG zaznamenal zastavení cyklu pro riziko nadměrné ovariální odpovědi 8.4 %

Komplikace indukce ovulace s intrauterinní inseminací

Komplikací indukce ovulace s intrauterinní inseminací může být:

- Reakce na zavedení spermií po swim-up
- Mimoděložní těhotenství
- Vícečetné těhotenství
- Ovariální hyperstimulační syndrom
- Ovariální absces

Reakce na zavedení spermií po swim-up

Reakcí ženy na intrauterinní zavedení spermií po swim-up mohou být křeče v podbřišku. Tyto křeče obvykle v krátké době ustanou, je vhodný krátkodobý klidový režim, případné podání spasmolytika. Nejde o častou komplikaci.

Mimoděložní těhotenství

Uhnízdění embrya mimo obvyklou lokalizaci v dutině děložní se vyskytuje asi u 1 % těhotenství po intrauterinní inseminaci. Nejčastějším abnormálním umístěním bývá vejcovod, dále roh děložní, dutina břišní apod.

Diagnóza bývá stanovena s využitím anamnézy, zhodnocení příznaků (např. bolesti v podbřišku) a klinických projevů (např. zvětšení dělohy, krvácení z rodidel), laboratorním průkazem zvýšené koncentrace gonadotropinu a ultrasonografickým vyšetřením. Ultrasonografické vyšetření především s využitím vaginální sondy prokáže buď prázdnou dutinu děložní s vysokým sekrečním endometriem, nebo dokonce plodové vejce (gestační váček) např. v rozšířeném vejcovodu v blízkosti vaječníku.

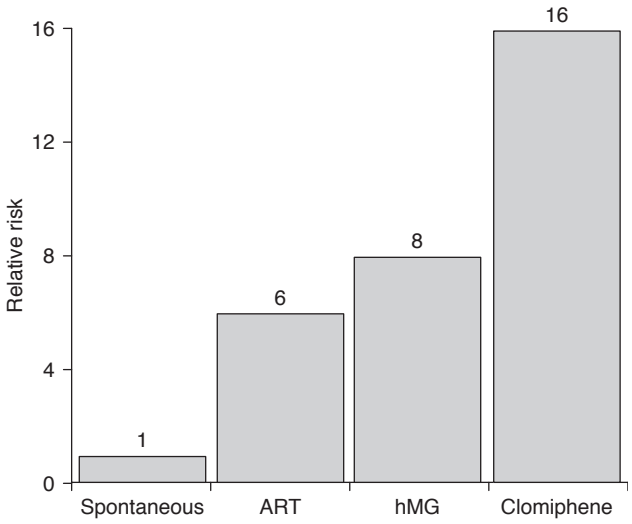
Terapií je operační léčba, dnes většinou s využitím minimálně invazivní chirurgie, laparoskopie. Operační léčba je buď konzervativní (naříznutí stěny vejcovodu a expulze plodového vejce), nebo radikální (vyjmutí poškozeného nebo zničeného vejcovodu). Indikací pro operaci bývá i podezření na přítomnost mimoděložního těhotenství, riziko krvácení z patologického umístění plodového vejce je značné a neléčené případy mohou mít i fatální průběh.

Vícečetné těhotenství

Jak již bylo ř ečeno výše, vícečetné těhotenství (myšleno především dvojčetné těhotenství) je většinou důsledkem ovariální stimulace s multi-folikulárním vývojem (dizygotní dvojčata, dvojčata dvojvaječná). Výjimečně prokazujeme i monozygotní dvojčata (dvojčata jednovaječná), vzniklá z jedné zygoty rozdělením embrya.

Pokud bychom nekladli důraz na prevenci, riziko dvojčetného těhotenství vzniklé jako důsledek indukce ovulace gonadotropiny, nebo zvláště klomifencitrátem, je 8 až 16 krát vyšší v porovnání se spontánním cyklem [140].

Graf č.3 Závislost rizika dvojčetného těhotenství na výběru metody asistované reprodukce



Převzato z [140].

Výsledky dostupných prací naznačují, že riziko vícečetného těhotenství v indukci ovulace společně s intrauterinní inseminací je možné snížit nastavením kritérií pro zrušení cyklu z důvodu nadměrné ovariální odpovědi.

Kritéria pro zrušení cyklu z důvodu nadměrné ovariální odpovědi:

- Přítomnost 4 a více folikulů o průměru > 14 mm
- Přítomnost 3 a více folikulů o průměru > 14 mm

Kritérium přítomnosti 4 a více folikulů o průměru > 14 mm (3 folikuly jsou ještě *adekvátní* odpověď) používá většina autorů. Např. Dankert [42] zaznamenal riziko zrušení cyklu pro nadměrnou ovariální odpověď 8.6 % a riziko vícečetného těhotenství 6 %.

Kritérium přítomnosti 3 a více folikulů o průměru > 14 mm (2 folikuly jsou *adekvátní* odpověď) použil Crosignani [141]. Autor prokázal riziko zrušení cyklů pro nadměrnou ovariální odpověď 6.6 a 4.1 % a riziko vícečetného těhotenství 8.1 %.

Kritéria pro zrušení cyklu z důvodu nadměrné ovariální odpovědi pomohla redukovat především vícečetné těhotenství (trojčetné a čtyřčetné). Většina vícečetných těhotenství jsou dnes těhotenství dvojčetná.

Obr. č. 15 Ultrazvukový průkaz dvojčetného těhotenství

Foto archiv autora.

I riziko vícečetného těhotenství 8 % zůstává stále vysoké. Dickey [142] retrospektivně analyzoval studie hodnotící stimulaci gonadotropiny společně s intrauterinní inseminací. Navrhuje strategii ke snížení rizika vícečetného těhotenství: použít klomifencitrát před aplikací gonadotropinů, minimální dávky

gonadotropinů, zrušení cyklů s průkazem více než 3 folikulů o průměru > 10-15 mm. Dickey vidí reálné snížení rizika vícečetného těhotenství na 2 % a méně.

Ovariální hyperstimulační syndrom

Jak již bylo ř ečeno výše, ovariální hyperstimulační syndrom většinou vzniká na podkladě aplikace vyšších dávek gonadotropinů společně s lidským choriovým gonadotropinem. V případě znalosti vysokého rizika k jeho rozvoji je hlavním preventivním opatřením zrušení cyklu.

K rozvoji OHSS se předpokládá *ovariální hypersenzitivita* na gonadotropiny s produkcí vysokých koncentrací VEGF (vascular endothelial growth factor), s aktivitou cytokinů (např. interleukin IL-2, IL- 6), TNF-alfa, endotelinu a rychlým nárůstem estradiolu. Především VEGF podporuje migraci a endoteliálních buněk, zvyšuje fenestraci a permeabilitu cév [52]. V důsledku zvýšené permeability cév dochází k přesunu tekutin z cév do dalších kompartmentů (především dutina břišní, výjimečně dutina hrudní, perikard).

Prevalence vážné formy OHSS je malá, 0.5 % [39].

Obr. č. 16 Ultrazvukový nález zvětšených vaječníků při OHSS

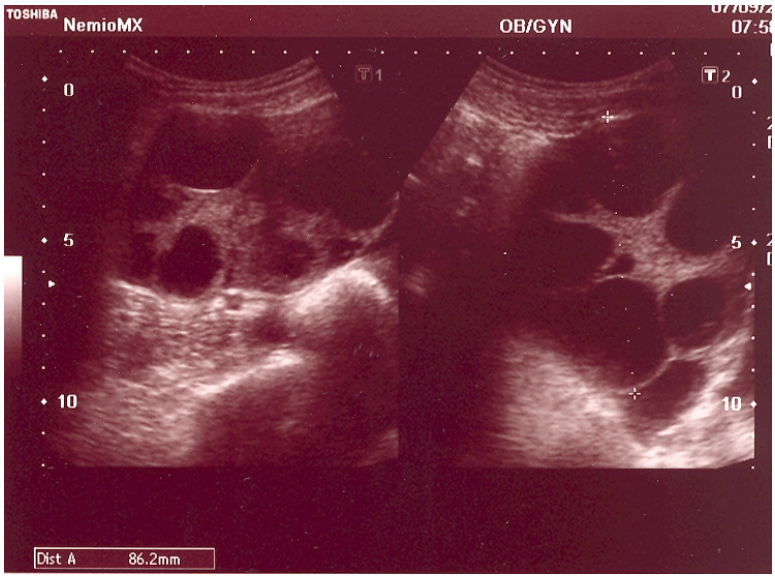


Foto archiv autora.

Obr. č. 17 Ultrazvukový průkaz počínajícího těhotenství společně mírným projevem OHSS

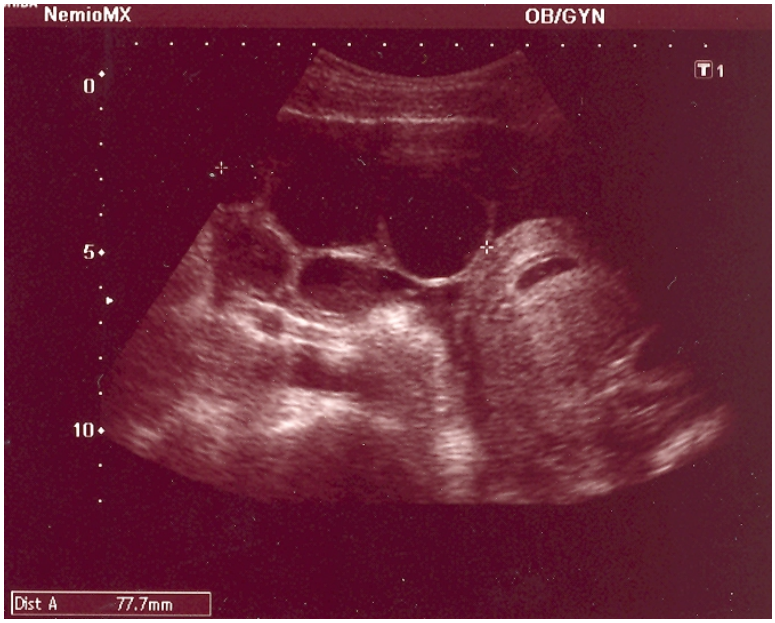


Foto archiv autora.

V současná je OHSS klasifikován dle Golana z roku 1989 [143]:

(1) Mírný OHSS

Grade 1, charakterizovaný zvětšením břicha a tlakem v podbříšku.

Grade 2, spojený s projevy grade 1 plus nauzea, zvracení, průjem, ovária jsou zvětšená 5- 12 cm.

(2) Střední OHSS

Grade 3, s projevy mírného OHSS plus ascites prokázaný ultrasonograficky.

(3) Vážný OHSS

Grade 4, charakterizovaný projevy středního OHSS plus známky ascités, hydrothorax a dýchací potíže.

Grade 5, všechny projevy zmíněné výše plus změny objemu krve, hemokoncentrace, koagulační abnormality, snížená perfúze funkce ledvin.

Projev OHSS může být:

- Časný, s projevy OHSS 3- 7 dní po aplikaci hCG, bývá spojen s nadměrnou ovariální odpovědí na léčbu gonadotropiny.
- Pozdní, s projevy OHSS 12- 17 dní po aplikaci hCG, většinou v souvislosti s těhotenstvím [144].

Ovariální hyperstimulační syndrom může být [40]:

- Spontánní, v jednotlivých případech se opakující u stejných pacientů.
- Spojený s aplikací klomifencitrátu a lidského choriového gonadotropinu.
- Po aplikaci gonadotropinů a lidského choriového gonadotropinu.

Spontánní OHSS je pozorován naprosto ojediněle [145, 146]. Dieterich popsal případ ženy, u které byl OHSS opakovaně prokázán v průběhu dvou spontánního těhotenství. Příčinou se jeví v mutaci receptoru FSH, kdy FSH receptor nepřiměřeně odpovídá na fyziologické hladiny choriového gonadotropinu v průběhu těhotenství [147].

OHSS spojený s podáním klomifencitrátu v dávkách 50 – 150 mg denně a aplikací lidského choriového gonadotropinu je také zcela výjimečný.

Základní otázky jsou:

(1) Je možné identifikovat rizikové pacientky?
(2) Jaký preventivní postup je vhodné použít u ženy s rizikem rozvoje OHSS?

Pro *predikci* ovariálního hyperstimulačního syndromu můžeme použít [49, 148]:

- OHSS v předchozích cyklu.
- Syndrom polycystických vaječníků.
- Vysoké koncentrace estradiolu (E2 ≥ 4 000 pg/ml).
- Zvýšený počet antrálních folikulů.

V *prevenci* ovariálního hyperstimulačního syndromu využíváme [49, 148]:

- Nižší dávkování gonadotropinů
- GnRH agonista (např. triptorelin 0.2 mg s.c.) ke konečné maturaci oocytů než urinární lidský choriový gonadotropin
- Zrušení cyklu (zrušení aplikace urinárního lidského choriového gonadotropinu)
- Oddálení aplikace urinárního lidského choriového gonadotropinu
- Snížení dávky urinárního lidského choriového gonadotropinu z 10 000 IU na 5 000 IU

- Aplikace rekombinantního lidského choriového gonadotropinu v dávce 250 μg/ml

Komplikace OHSS mohou zahrnovat [40]:

- Torze adnex
- Tromboembolie
- Syndrom dechové tísně
- Ledvinné selhání
- Jaterní selhání
- Zcela mimořádné fatální případy

Terapie mírného a středního stupně OHSS:

- Klidový režim
- Podání tekutin per os
- Aplikace nízkomolekulárních heparinů jako prevence tromboembolické choroby
- Punkce ascitu v ambulantním provedení

Terapie vážného stupně OHSS:

- Hospitalize, klidový režim, aplikace nízkomolekulárních heparinů
- Infůsní podání tekutin a iontů
- Punkce ascitu
- Léčba komplikací

Ovariální absces

V literatuře byl popsán případ ovariálního abscesu po stimulaci ovulace [149]. Komplikace byla řešena konzervativně.

Pro páry s idiopatickou neplodností a mírným andrologickým faktorem *v době realizace studie nebyl znám jednotný algoritmus, podle kterého by bylo možné určit správnou počáteční dávku gonadotropinů.*

Hypotéza ověřovaná ve studii

Naší hypotézou bylo, že počáteční denní dávka 75 nebo 100 IU folitropinu beta v porovnání s počáteční denní dávkou 50 IU zvyšuje pravděpodobnost dosažení těhotenství na podkladě vyššího počtu folikulů, zvyšuje celkovou spotřebu gonadotropinů a současně snižuje riziko zrušení cyklu pro nízkou ovariální odpověď. Na druhé straně jsme očekáváli mírné zvýšení rizika vícečetného těhotenství a rizika zrušení cyklu pro nadměrnou ovariální odpověď.

Předmět studie

Předmětem studie bylo srovnání účinku tří rozdílných počátečních dávek folitropinu beta (PUREGON PEN 50, 75 a 100 IU denně) na počet folikulů, výšku sliznice v době aplikace lidského choriového gonadotropinu, celkovou spotřebu gonadotropinů na cyklus, pravděpodobnost dosažení klinického těhotenství a zrušení cyklů pro nízkou, nebo nadměrnou ovariální odpověď, případně riziko OHSS.

Nízkou ovariální odpovědí rozumíme nepřítomnost folikulů > 12 mm při ultrazvukové kontrole v den 9 menstruačního cyklu.

Přiměřenou ovariální odpovědí (adekvátní ovariální odpovědí) rozumíme přítomnost 1-3 folikulů o průměru ≥ 18 mm v den aplikace lidského choriového gonadotropinu.

Nadměrnou ovariální odpovědí rozumíme přítomnost > 3 folikulů o průměru ≥ 14 mm.

Cíle disertační práce

Cílem práce bylo zhodnotit správnost určení počátečních dávek folitropinu beta na základě znalosti ovariální odpovědi na dříve podaný klomifencitrát v indukci ovulace společně s intrauterinní inseminací.

Předmětem studie bylo porovnat účinek 3 rozdílných počátečních dávek rekombinantního gonadotropinu- folitropinu beta (PUREGON PEN 50, 75 a 100 IU denně) na:

- Počet folikulů v jednotlivých skupinách
- Zastoupení mono-folikulárního vývoje
- Výšku sliznice v době aplikace lidského choriového gonadotropinu
- Celkovou spotřebu gonadotropinů na cyklus
- Délku trvání léčebného cyklu (den provedení intrauterinní inseminace)
- Pravděpodobnost dosažení klinického těhotenství v kombinaci s intrauterinní inseminací
- Pravděpodobnost potratu
- Pravděpodobnost zrušení cyklů pro nízkou ovariální odpověď
- Pravděpodobnost zrušení cyklů pro nadměrnou ovariální odpověď
- Pravděpodobnost vícečetného těhotenství
- Pravděpodobnost ovariálního hyperstimulačního syndromu

Soubor nemocných, statistická analýza

Neplodností jsme charakterizovali stav, kdy se páru po minimálně 1 roku nechráněnému pohlavnímu styku nepodařilo otěhotnět.

Soubor tvořilo 90 pacientek, které jsme cíleně poučili. Od března 2005 do června 2006 jsme *prospektivně* sledovali 90 léčebných cyklů. Indikací léčby byla idiopatická neplodnost, mírný andrologický faktore nebo normogonadotropní anovulace (ne syndrom polycystických vaječníků).

Vstupní kritéria byla: věk 18-38 let, BMI 18-30 kg/m2, basální hodnoty FSH a LH ≤ 10 IU/l, normální tvar dutiny děložní a prokázaná průchodnost vejcovodů hysterosalpingografií, příp. diagnostickou hysteroskopií a laparoskopií s chromopertubací, léčba klomifencitrátem s průkazem ovulace v anamnéze, počet spermií po swim up ≥ 5 mil/ml.

Kritéria zamítnutí účasti ve studii byla: spontánní těhotenství, přítomnost ovariální cysty, gynekologické krvácení neznámé etiologie, věk ≥ 39 let, BMI > 30 kg/m2, FSH nebo LH > 10 IU/l, syndrom polycystických vaječníků, prokázaná klomifencitrátová rezistence. Minimální endometrióza nebyla příčinou zamítnutí účasti ve studii.

Na základě anamnestické odpovědi na podání klomifencitrátu jsme pacientky rozdělili do skupin s denní počáteční dávkou 50, 75 a 100 IU folitropinu beta.

Pacientky s prokázanou ovariální odpovědí na klomifencitrát 50 mg denně (1 tableta denně) jsme zařadili do *skupiny 50 IU folitropinu beta denně*. Pacientky s nízkou ovariální odpovědí na klomifencitrát 50 mg denně, ale v následném cyklu s prokázanou ovariální odpovědí na klomifencitrát 100 mg denně (2 tablety denně) jsme zařadili do *skupiny 75 IU folitropinu beta*. Pacientky s nízkou ovariální odpovědí na klomifencitrát 100 mg denně, ale v následném cyklu s prokázanou ovariální odpovědí na klomifencitrát 150 mg denně (3 tablety denně) jsme zařadili do *skupiny 100 IU folitropinu beta*. Pacientky bez průkazu ovulace po podání klomifencitrátu (tzv. klomifencitrátová rezistence) nebyly do studie zařazeny.

Metodika:

1. Před aplikací gonadotropinů jsme palpačním gynekologickým vyšetřením vyloučili akutní zánětlivé onemocnění zevních a vnitřních rodidel a dále jsme ultrazvukovým vyšetřením (Toshiba Famio s 7,5 MHz vaginální sondou) vyloučili přítomnost ovariální cysty.
2. V den 3 menstruačního cyklu jsme začali subkutánní aplikaci určené počáteční dávky folitropinu beta.
3. Ovariální odpověď (folikulární vývoj) jsme monitorovali ultrazvukovým vyšetřením v den 9 menstruačního cyklu a v případě potřeby jsme upravili dávku gonadotropinů (dávky folitropinu beta jsme zvýšili o 25 IU při prokázání folikulů o průměru ≤ 12 mm; při prokázání folikulů o průměru ≥ 14 mm dávku ponechali skupině 50 IU a 75 IU nebo ve skupině 100 IU folitropinu beta dávku snížili o 25 IU).
4. *Lidský choriový gonadotropin- hCG (PREGNYL) 5 000 IU jsme aplikovali podkožně při prokázání průměru folikulu ≥ 18 mm a výšky endometria nejméně 7 mm.*
5. Pokud jsme prokázali přítomnost > 3 folikulů o průměru ≥ 14 mm, cyklus jsme zrušili z obavy před vysokým rizikem vzniku vícečetného těhotenství a OHSS. V tomto případě nebyl aplikován choriový gonadotropin a pár byl poučen o chráněném pohlavním styku.
6. *Intrauterinní inseminaci jsme realizovali po 36 hodinách od aplikace hCG pomocí Cookova katétru po přípravě spermií metodou swim-up.*
7. Luteální fázi jsme podpořili mikronizovaným progesteronem 200 mg denně vaginálně (UTROGESTAN) od následujícího dne po provedení inseminace.
8. Těhotenský test jsme realizovali za 14 dní od provedení inseminace.
9. Průkaz klinického těhotenství jsme realizovali v 8. týdnu amenorhei, definovali jsme jej jako přítomnost srdeční akce u plodu přiměřené velikosti. Probíhající těhotenství („ongoing pregnancy“) definujeme jako prosperující těhotenství po 12. týdnu amenorhei.

Statistickou analýzu jsme provedli pomocí χ^2 testu a ANOVA (metoda analýzy variace) programem GraphStat. Hladinu významnosti alfa 0.05 ($p<0.05$) považujeme za statisticky významnou. Statisticky nevýznamná data značíme ns.

Vlastní výsledky

Hodnotili jsme celkový počet 90 ovariálních stimulací u 90 žen s idiopatickým faktorem neplodnosti, anovulací nebo párů s mírným andrologickým faktorem. Realizovali jsme 85 intrauterinních inseminací (95 % cyklů indukce ovulace).

Základní charakteristiky pacientek v jednotlivých skupinách popisuje tabulka 5. Při hodnocení věku léčených žen, zastoupení primární neplodnosti a trvání neplodnosti nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Tabulka 5: Základní charakteristiky pacientek

	50 IU (n=35)	**75 IU** (n=41)	**100 IU** (n=14)	**p**
Věk (roky) [a]	30 ± 3	30 ± 3	29 ± 4	ns
Primární neplodnost (%) [b]	25 (71 %)	27 (65 %)	8 (58 %)	ns
Trvání neplodnosti (roky) [b]	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.7	1.9 ± 1.1	ns

[a] Výsledky jsou vyjádřené jako aritmetický průměr ±SD, ANOVA

[b] Analýza četnosti χ^2 test

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Příčiny neplodnosti v jednotlivých skupinách shrnuje tabulka 6.

Tabulka 6: Příčiny neplodnosti

	50 IU (n=35)	**75 IU** (n=41)	**100 IU** (n=14)	**p**
Idiopatický faktor (%) [b]	1 (3 %)	1 (2 %)	0 (0 %)	ns
Anovulace (%) [b]	13 (35 %)	12 (28 %)	8 (57 %)	ns
Mírný andrologický faktor (%) [b]	21 (60 %)	29 (69 %)	5 (36 %)	ns
Endometrióza (%) [b]	0 (0) %	0 (0) %	1 (7 %)	ns

[b] Analýza četnosti χ^2 test

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Hormonální charakteristiky pacientek v jednotlivých skupinách popisuje tabulka 7.

Tabulka 7: Hormonální charakteristiky pacientek

	50 IU (n=35)	**75 IU** (n=41)	**100 IU** (n=14)	**p**
FSH (IU) [a]	6.8 ± 1.5	6.6 ± 1.5	6.8 ± 1.2	ns
LH (IU) [a]	5.6 ± 2.0	5.7 ± 2.4	7.1± 2.3	ns

[a] Výsledky jsou vyjádřené jako aritmetický průměr ±SD, ANOVA

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Charakteristiky cyklů podle skupin uvádí tabulka 8.

Tabulka 8: Charakteristiky cyklů

	50 IU (n=35)	**75 IU** (n=41)	**100 IU** (n=15)	**p**
Monofolikulární vývoj n (%) [b]	10 (29 %)	13 (31 %)	4 (28 %)	ns
Počet folikulů ≥ 16 mm [a]	2.0 ± 0.8	2.2 ± 1.1	2.5 ± 1.8	ns
Výška endometria (mm) [a]	8.5 ± 0.9	8.7 ± 1.4	9.1 ± 1.8	ns
Celková spotřeba rFSH (IU) [a]	483 ± 192	600 ± 151	830 ± 268	p<0.001
Provedení IUI (dny) [a]	13.3 ± 1.7	13.2 ± 1.7	13.4 ± 1.8	ns
Minimální dávka (IU)	300	375	500	
Maximální dávka (IU)	1100	1050	1350	

[a] Výsledky jsou vyjádřené jako aritmetický průměr ±SD, ANOVA

[b] Analýza četnosti χ^2 test

Celková spotřeba folitropinu beta byla statisticky významně vyšší ve skupině žen s počáteční denní dávkou 75 IU a 100 IU v porovnání se skupinou žen s počáteční denní dávkou 50 IU (p<0.001).

Pozorovali jsme mírné, ale ne statisticky významné, rozdíly v počtu folikulů a výšce endometria mezi skupinami.

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly v trvání léčby (den provedení intrauterinní inseminace) mezi skupinami.

Důvody pro zrušení cyklu jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Důvody pro zrušení cyklů

	50 IU (n=35)	**75 IU** (n=41)	**100 IU** (n=14)	**p**
Zrušení cyklů n (%) [b]	4 (11 %)	1 (2 %)	0	ns
Důvody pro zrušení cyklů:				
Nízká ovariální odpověď n (%) [b]	3 (8 %)	0	0	ns
Více než 3 folikuly 14 mm n (%) [b]	0	1 (2 %)	0	ns
Folikul na straně salpingektomie n (%) [b]	1 (3 %)	0	0	ns

[b] Analýza četnosti χ^2 test

Celkově jsme zrušili 5 cyklů (celkové riziko zrušení cyklu 5.5 %).

Pro nízkou ovariální odpověď jsme zrušili 3 cykly

Pro nadměrnou ovariální odpověď jsme zrušili cyklus pouze 1.

Z důvodu přítomnosti folikulu na straně odstranění vejcovodu (salpingektomie) jsme zrušili také 1 cyklus.

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Výsledky léčby ukazuje tabulka 10.

Tabulka 10: Výsledky léčby

	50 IU (n=31)	**75 IU** (n=40)	**100 IU** (n=14)	**p**
Klinické těhotenství n (%) [b]	7 (22 %)	4 (10 %)	4 (28 %)	ns
Potrat n (%) [b]	1 (3 %)	0	0	ns
Probíhající těhotenství n (%) [b]	6 (19 %)	4 (10 %)	4 (28 %)	ns

[b] Analýza četnosti χ^2 test

Klinické těhotenství jsme prokázali v 7, 4 a 4 případech, pravděpodobnost dosažení klinického těhotenství k dokončenému cyklu byla 22 %, 10 % a 28 % v jednotlivých skupinách. Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

V souhrnu *klinický těhotenský index* byl 18 % (15 klinických těhotenství v 85 dokončených cyklech).

Spontánní potrat jsme zaznamenali v 1 případě z 15 těhotenství (celkové riziko vztažené ke všem těhotenstvím bylo 6.6 %).

V souhrnu *probíhající těhotenství* jsme prokázali v 16.4 % (14 klinických těhotenství v 85 dokončených cyklech).

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Komplikace léčby vztažené k počtu probíhajících těhotenství popisuje tabulka 11.

Tabulka 11: Komplikace léčby

	50 IU (n=6)	**75 IU** (n=4)	**100 IU** (n=4)	**p**
Dvojčetné těhotenství n (%) [b]	0	1 (25 %)	1 (25 %)	ns
Trojčetné těhotenství n (%) [b]	0	0	0	ns
OHSS n (%) [b]	0	0	0	ns

[b] Analýza četnosti χ^2 test

Prokázali jsme celkově 2 případy dvojčetného těhotenství.

Celkové riziko vícečetného těhotenství bylo 14 % (2 případy vícečetného těhotenství vztažené ke 14 probíhajícím těhotenství.

Nepozorovali jsme projev ovariálního hyperstimulačního syndromu.

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Diskuze

Určení počátečních dávek folitropinu beta na základě znalosti ovariální odpovědi na dříve podaný klomifencitrát je nový postup, který nebyl dosud publikován.

Srovnáme-li výsledky naší studie s výsledky studií uvedených v „Úvodu do problematiky“, můžeme vysvětlit následující skutečnosti:

Počet folikulů v jednotlivých skupinách

V naší studii jsme prokázali v jednotlivých skupinách 2.0 ± 0.8, 2.2 ± 1.1 a 2.5 ± 1.8 folikulů (ns).

Počet folikulů v naší práci **byl vyšší** v porovnání se studií Crosignani [141]. Crosignani použil počáteční dávku 50 IU rFSH pro obě skupiny a shledal 1.5 ± 0.7 vs. 1.5 ± 0.7 folikulů v obou skupinách. Zjištění, že počet folikulů roste s dávkou gonadotropinů **odpovídá** našemu předpokladu.

Studie Dankerta [42] počet folikulů nepopisovala.

Leader [43] počet folikulů také nezaznamenal.

Mono-folikulární odpověď

Mono-folikulární vývoj jsme v naší práci prokázali v 29, 31 a 28 % v jednotlivých skupinách.

Incidence mono-folikulárního vývoje **byla v naší práci v souladu** se studií Leadera [43]. Tato studie pozorovala mono-folikulární incidenci 41.3% ve skupině se zvýšením o 25 IU vs. 21.8% ve skupině se zvýšením o 50 IU gonadotropinů při prokázané nízké ovariální odpovědi na počáteční dávky. Zjištění, že incidence mono-folikulárního vývoje je nejvyšší u nejnižších počátečních dávek gonadotropinů **odpovídá** našemu předpokladu. Ten byl, že pokud bychom ženám v naší studii podali dávku vyšší (např. 100 IU) místo studovaných 50 IU denně, incidence mono-folikulárního vývoje by byla nižší.

Studie Dankerta [42] mono-folikulární vývoj nezjišťovala.

Výška sliznice v době aplikace lidského choriového gonadotropinu

Výška sliznice v době aplikace lidského choriového gonadotropinu byla v naší práci 8.5 ± 0.9, 8.7 ± 1.4 a 9.1 ± 1.8 mm.

Přestože výsledky nejsou statisticky signifikantní naznačují, že se zvyšujícími se koncentracemi estradiolu (pod vlivem vyšších dávek gonadotropinů) se zvyšuje i endometrium, což **odpovídá** našemu předpokladu.

Celková spotřeba gonadotropinů na cyklus

Celková spotřeba gonadotropinů na cyklus byla v naší práci (IU) 483 ± 192, 600 ± 151 a 830 ± 268 ($p<0.001$).

Celková spotřeba gonadotropinů ve skupině žen s počáteční dávkou 50 IU byla v naší práci **nižší** než u Leadera. Leader [43] také při počáteční denní dávce 50 IU prokázal spotřebu gonadotropinů 887 IU vs. 984 IU ve skupinách žen se zvýšením o 25 IU vs. 50 IU.

Vysvětlení vidíme ve skutečnosti, že ženy léčené v naší studii byly předléčeny klomifencitrátem a pouze ženám s příznivou reakcí na 50 mg klomifencitrátu byly podány gonadotropiny v počáteční denní dávce 50 IU.

Délku trvání léčebného cyklu

Den provedení intrauterinní inseminace byl v naší studii 13.3 ± 1.7, 13.2 ± 1.7 a 13.4 ± 1.8. I přes vzrůstající počáteční dávky gonadotropinů byl nakonec vývoj folikulů stejně rychlý.

Trvání léčebného cyklu bylo v naší studii **shodné** s prací Leadera [43], který zaznamenal 14.0 vs. 13.4 dní ve skupinách žen se zvýšením gonadotropinů o 25 IU vs. 50 IU.

Pravděpodobnost dosažení klinického těhotenství

V naší studii jsme dosáhli *těhotenského indexu* 18 %.

Těhotenský index v naší práci **byl nižší** v porovnání se studií Dankerta [42]. Tato studie prokázala *těhotenský index* 34 % a pravděpodobnost porodu plodu 27 % ve skupině žen léčených gonadotropiny. Tento těhotenský index byl vyšší

než v naší studii. Vysvětlení nacházíme ve skutečnosti, že ženy v naší studii byly již anamnesticky léčeny klomifencitrátem s úspěšností 12 %.

Těhotenský index v naší práci **byl shodný** v porovnání s prací Leadera [43], který popsal 20 % ve skupině se zvýšením 25 IU vs. 12.8 % (ns) ve skupině se zvýšením o 50 IU.

Těhotenský index v naší práci **byl vyšší** v porovnání se studií Crosignani [141], který prokázal 12.2 a 12.6 %. Přes dostupnost informací o výhodách gestagenní podpory luteální fáze mezinárodní tým studie v protokolu nepoužíval mikronizovaný progesteron tak, jak jsme naši studii preferovali my.

Riziko potratu

V naší práci jsme *spontánní potrat* zaznamenali v 1 případě z 18 těhotenství. Celkové riziko potratu bylo 5.5 %.

Guzick [41] zaznamenal 20 % spontánních potratů.
Dankert [42] popsal riziko spontánního potratu 9.9 % ve skupině žen léčených klomifencitrátem a 7.5 % ve skupině žen léčených gonadotropiny.
Leader [43] prokázal 2 případy potratu ve skupině se zvýšením 25 IU vs. 3 případy ve skupině se zvýšením o 50 IU. Riziko potratu bylo 5 %.

Riziko potratu **odpovídá** předpokladům.

Riziko zrušení cyklů pro nízkou ovariální odpověď

Počet cyklů zrušených pro nízkou ovariální odpověď byl v naší práci 3 z celkově 90 cyklů (celkové riziko 3.3 %).

Toto ***riziko je výrazně nižší*** než popsal Crosignani [141] 13.2 % i zaznamenal Leader [43] 5 %.

Vysvětlení nalézáme ve skutečnosti, že počáteční dávka gonadotropinů 75 a 100 IU v naší práci byla vyšší než 50 IU FSH, které použili Leader i Crosignani.

Riziko zrušení cyklů pro nadměrnou ovariální odpověď

Počet cyklů zrušených pro nadměrnou ovariální odpověď byl v naší práci pouze 1 z 90 sledovaných (celkové riziko 1.1 %).

V naší práci je toto ***riziko výrazně nižší*** než výsledky studií Leadera, Sagnella, Dankerta i Crosignani.

Leadera [43] zrušil 5 % vs. 20.5 % cyklů ve skupinách žen se zvýšením gonadotropinů o 25 IU vs. 50 IU.

Sagnella [136] zaznamenal riziko zrušení cyklu pro nadměrnou ovariální odpověď 8.4 %.

Dankert [42] popsal riziko zrušení cyklu pro nadměrnou ovariální odpověď 8.6 % (ve skupině klomifencitrátu 17 cyklů z 199, ve skupině rFSH 18 případů z 207)! Tohoto výsledku Dankert dosáhl při počáteční dávce 75 IU rFSH denně, zvýšení dávky gonadotropinů pouze o 37.5 IU a zrušení cyklu při průkazu 4 a více folikulů. Pokud by kritérium pro zrušení cyklu byla přítomnost jen 3 folikulů, riziko zrušení cyklu pro nadměrnou ovariální odpověď by bylo ještě vyšší.

Crosignani [141] prokázal riziko zrušení cyklů pro nadměrnou ovariální odpověď v 6.6 a 4.1 %. Pro porozumění je nutno připomenout, že počáteční dávka rekombinantních gonadotropinů v obou větvích studie byla 50 IU denně. Dále je nutno zdůraznit, že Crosignani stanovil kritéria pro zrušení cyklu na počet folikulů > 2 o průměru alespoň 14 mm. Tento přístup je ještě přísnější, než používala většina ostatních studií.

Riziko vícečetného těhotenství

Vícečetné těhotenství jsme prokázali ve 14 %. Ve všech případech se jednalo o *těhotenství dvojčetná. Trojčetné těhotenství* jsme v naší studii při uplatnění preventivních postupů vedoucích ke zrušení cyklu při nadměrné ovariální odpovědi neprokázali.

Riziko vícečetného těhotenství bylo v naší práci **nižší** v porovnání s Wangem, Hamilton-Fairley a Guzickem:

Wang [33] zaznamenal riziko vícečetného těhotenství 36.3 %.

Hamilton-Fairley [35] prokázal 36 % riziko vícečetného těhotenství při použití konvenční počáteční dávky 75 IU gonadotropinů.
Guzicka [41] popsal 18 případů *dvojčetného těhotenství*, 4 případy *trojčetného těhotenství* a dokonce 3 případy *těhotenství čtyřčetného*. 17 z 18 případů dvojčetného těhotenství vznikla ve skupině žen léčených gonadotropiny. U čtyřčetných těhotenství autor realizoval fetoredukci. Celkový počet případů vícečetného těhotenství byl 25, riziko vícečetného těhotenství bylo celkově 13.4 %, ve skupině žen s aplikací gonadotropinů však 23.6 %!

Riziko vícečetného těhotenství bylo v naší práci **prakticky shodné** v porovnání s Crosignani, Leaderem a Dankertem:
Crosignani [141] prokázal 3 případy vícečetného těhotenství v jedné větvi studie, celkové riziko bylo 8.1 % (3 případy vícečetného těhotenství na 37 prokázaných těhotenství).
Leader [43] popsal riziko vícečetného těhotenství 12.5 % ve skupině se zvýšení o 25 IU.

Dankert [42] pozoroval celkové riziko vícečetného těhotenství 6 %. Jedno dvojčetné těhotenství a 1 trojčetné vzniklo ve skupině žen léčených klomifencitrátem, jedno dvojčetné těhotenství vzniklo ve skupině s rekombinantním FSH. Připomínáme, že tohoto výsledku Dankert dosáhl při **uplatnění přísných preventivních opatření**. Přesto je potřeba zdůraznit riziko trojčetného těhotenství spojené s podáním klostilbegytu!

Práce la Cour Freiesleben [51] srovnávala 115 žen se standardní stimulací (dávka 75 IU folitropinu beta) s 113 ženami se stimulací individuální (individuální dávka byla určena na základě nomogramu, který byl založen na tělesné hmotnosti a znalosti počtu antrálních folikulů). **Individuální dávkování snížilo riziko vícečetného těhotenství z 25 % na 5 %!**

Riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu

Ovariální hyperstimulační syndrom jsme v naší studii nepozorovali.

Výsledky naší práce vynikají ve srovnání s výsledky Wanga, Hamilton-Fairley a Guzicka. Pro pochopení souvislostí zmiňujeme záměrně i datum publikování studií.
Wang [33] v roce 1980 pozoroval celkové riziko OHSS v 11.7 % (7.8 % riziko středního stupně OHSS a 3.9 % riziko vážného stupně OHSS).

Hamilton-Fairley [35] v roce 1990 popsal dokonce 4.6 % riziko vážného stupně OHSS po stimulaci gonadotropiny.
Guzick [41] v roce 1999 zaznamenal 6 případů OHSS s nutností hospitalizace! 3 z těchto žen byly těhotné.

Je nutné zdůraznit, že současné studie neprokazují případy OHSS při uplatnění dnes již běžných preventivních opatřeních. Toto potvrzuje např. Dankert [42] i Crosignani [141]. Tyto skutečnosti jsou **v souladu** s našimi výsledky.

O to jsou větším překvapením výsledky Leadera [43], který ještě v roce 2006 pozoroval 5 případů OHSS u 158 léčených žen (riziko OHSS 3.2 %) v obou skupinách. **Vhodným preventivním opatřením se proto jeví zvýšit dávku gonadotropinů důsledně pouze o 25 IU!**

Metodika naší práce odpovídá možnostem medicíny v době vzniku studie. Z testů ovariální rezervy (ovariální odpovědi) bylo v té době reálné pouze vyšetření koncentrace FSH. Dnes běžně vyšetřovaná koncentrace AMH nebyla dostupná a metodika určení AFC nám nebyla ještě známa. Navíc i dnes např. koncentrace inhibinu B zůstává testem experimentálním. Jiná studie (pravděpodobně multicentrická) bude v budoucnu nezbytná pro porovnání ostatních, dnes běžně používaných testů a vyšetření ovariální rezervy (ovariální odpovědi).

Omezením naší studie by mohla být *velikost souborů* (počet žen v jednotlivých skupinách). Přesto jsme prokázali signifikantně zvýšenou celkovou spotřebu gonadotropinů mezi skupinami v návaznosti na zvýšenou počáteční dávku folitropinu beta.

V souhrnu, naše studie naznačila nejnižší účinné dávky gonadotropinů zvolené na základě znalosti ovariální odpovědi na dříve podaný klomifencitrát a umožnila určit jednoduchý a snadný prognostický parametr pro pozdější ovariální odpověď v průběhu stimulace v programu intrauterinních inseminací.

Věříme, že výsledky naší práce budou užitečné ve snaze o individualizaci léčby se záměrem maximalizovat dosažení těhotenství, minimalizovat riziko zrušení cyklů s nízkou i nadměrnou ovariální odpovědí a tím preventivně působit proti vzniku vícečetného těhotenství a ovariálního hyperstimulačního syndromu.

Obr. č. 18 Ultrazvukový obraz probíhajícího jednočetného těhotenství

Foto archiv autora.

Závěry

- Potvrdili jsme hypotézu, že ke stanovení správné počáteční dávky folitropinu beta přispívá znalost předchozí ovariální odpovědi na klomifencitrát. Dávka 50 IU folitropinu beta denně byla vhodná počáteční dávka pro ženy příznivě reagující na dříve podaný klomifencitrát v dávce 50 mg denně.

- Denní dávky 75 IU i 100 IU folitropinu beta signifikantně zvyšují celkovou spotřebu gonadotropinů.

- Denní dávky 75 IU i 100 IU folitropinu beta nezvyšují pravděpodobnost dosažení klinického těhotenství při určení počáteční dávky folitropinu beta na základě znalosti předchozí ovariální odpovědi na klomifencitrát.

- Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly v riziku potratu v jednotlivých skupinách.

- Denní dávky 75 IU i 100 IU folitropinu beta mohou zvýšit riziko vícečetného těhotenství.

- Naše výsledky potvrdily nízké riziko zrušení cyklu pro nedostatečnou i nadměrnou ovariální odpověď a současně bezpečnost postupu (nepozorovali jsme ani jeden případ ovariálního hyperstimulačního syndromu).

Autor se léčbě neplodnosti věnuje od roku 1995. Především v průběhu let 1997-2005 byl konfrontován s komplikacemi indukce ovulace a mimotělního oplodnění (jak vícečetná těhotenství i OHSS s nutností hospitalizace).

Prof. Bruno Lunenfeld, prof. Botros Rizk, prof. B.C. Fauser, prof. George Griesinger aj. jsou autoru příkladem v jejich mnohdy celoživotním hledání bezpečných léčebných postupů pro pacientky. Díky osobním setkáním a studiem jejich prací autor souhlasí s heslem „prevention is better than traetment“.

Literatura

1. MACKLON, N.S., BROEKMANS, F.J., FAUSER, B. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 3. vydání editor GARDNER, D.K., WEISSMAN, A., HOWLES, C., SHOHAM, Z. London: Martin Dunitz, 2009, 912 s. ISBN 978-0-415-44894-9, Kapitola 34, Indications for IVF treatment: from diagnosis to prognosis, s. 447- 458.
2. Infertility revisited: the state of the art today and tomorrow. The ESHRE Capri Workshop. European Society for Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod*, 1996, vol. 11, no. 8, s. 1779-1807.
3. LASS, A. *A textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, 2. vydání editor Brinsden, P.R. New York: The Parthenon Publishing Group, 1999, 563 s. ISBN 1-85070-000-1, Kapitola Investigation of the infertile couple for assisted conception, s. 13-26.
4. RAY, A., SHAH, A., GUDI, A. and HOMBURG, R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online*, 2012, vol. 2, no. 6, s. 591-602.
5. EZRA, Y., SIMON, A. and LAUFER, N. Defective oocytes: a new subgroup of unexplained infertility. *Fertil Steril*, 1992, vol. 58, no. 1, s. 24-27.
6. BRONET, F., MARTINEZ, E., GAYTAN, M., LINAN, A., CERNUDA, D., ARIZA, M., NOGALES, M., PACHECO, A., SAN CELESTINO, M. and GARCIA-VELASCO, J.A. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod*, 2012, vol. 2, no. 7, s. 1922-1929.
7. LIU, D.Y., LIU, M.L. and BAKER, H.W. Enhancement of sperm-zona pellucida (ZP) binding capacity by activation of protein kinase A and C pathways in certain infertile men with defective sperm-ZP binding. *Hum Reprod*, 2009, vol. 2, no. 1, s. 20-27.
8. TURKYILMAZ, E., GUNER, H., ERDEM, M., ERDEM, A., BIRI, A.A., KONAC, E., ALP, E., ONEN, H.I. and MENEVSE, S. NLF2 gene expression in the endometrium of patients with implantation failure after IVF treatment. *Gene*, 2012, vol. 508, no. 1, s. 140-143.
9. GOSWAMI, D. and CONWAY, G.S. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*, 2005, vol. 11, no. 4, s. 391-410.
10. DAVIS, C.J., DAVISON, R.M. and CONWAY, G.S. Genetic basis of premature ovarian failure. *Hum Fertil* (Camb), 1998, vol. 1, no.1, s. 20-22.
11. KALANTARIDOU, S.N., DAVIS, S.R. and NELSON, L.M. Premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998, vol. 27, no. 4, s. 989-1006.
12. NELSON, L.M., COVINGTON, S.N. and REBAR, R.W. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertil Steril*, 2005, vol. 83, no. 5, s. 1327-1332.
13. SANTORO, N. Update in hyper- and hypogonadotropic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, vol. 96, no. 11, s. 3281-3288.
14. DE LA ROCHEBROCHARD, E., MCELREAVEY, K. and THONNEAU, P. Paternal age over 40 years: the "amber light" in the reproductive life of men? *J Androl*, 2003, vol. 24, no. 4, s. 459-465.
15. LERIDON, H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod,* 2004, vol. 19, no. 7, s. 1548-1553.

16. NAVOT, D., BERGH, P.A., WILLIAMS, M.A., GARRISI, G.J., GUZMAN, I., SANDLER, B. and GRUNFELD, L. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*, 1991, vol. 337, no. 8754, s. 1375-1377.
17. HASSOLD, T. and CHIU, D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet,* 1985, vol. 70, no. 1, s. 11-17.
18. NYBO ANDERSEN, A.M., WOHLFAHRT, J., CHRISTENS, P., OLSEN, J. and MELBYE, M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*, 2000, vol. 320, no. 7251, s. 1708-1712.
19. TAN, S.L., ROYSTON, P., CAMPBELL, S., JACOBS, H.S., BETTS, J., MASON, B. and EDWARDS, R.G. Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilisation. *Lancet*, 1992, vol. 339, no. 8806, s. 1390-1394.
20. TEMPLETON, A., MORRIS, J.K. and PARSLOW, W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*, 1996, vol. 348, no. 9039, s. 1402-1406.
21. PIETTE, C., DE MOUZON, J., BACHELOT, A. and SPIRA, A. In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates. *Hum Reprod*, 1990, vol. 5, no. 1, s. 56-59.
22. KAJANOJA, P. and WIDHOLM, O. Pregnancy and delivery in women aged 40 and over. *Obstet Gynecol*, 1978, vol. 51, no. 1, s. 47-51.
23. GURTCHEFF, S.E. and KLEIN, N.A. Diminished ovarian reserve and infertility. *Clin Obstet Gynecol*, 2011, vol. 54, no. 4, s. 666-674.
24. COSTELLO, M.F. and LEDGER, W.L. Evidence-based lifestyle and pharmacological management of infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Womens Health* (Lond Engl), 2012, vol. 8, no. 3, s. 277-290.
25. CRAIG, Z.R., WANG, W. and FLAWS, J.A. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction*, 2011, vol. 142, no. 5, s. 633-646.
26. MARK-KAPPELER, C.J., HOYER, P.B. and DEVINE, P.J. Xenobiotic effects on ovarian preantral follicles. *Biol Reprod*, 2011, vol. 8, no. 5, s. 871-883.
27. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), *Most recent ART data* [online]. Datum publikování 1.8.2012, poslední revize 20.12.2012 [cit. 2013-01-28]. Dostupné z: <www.cdc.gov/art/>.
28. SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNIQUE and AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, Assisted reproductive technology in the United States: 2001 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril*, 2007, vol. 87, no. 6, s. 1253-1266.
29. PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, Use of exogenous gonadotropins in anovulatory women: a technical bulletin. *Fertil Steril*, 2008, vol. 90, no. 5 Suppl, s. S7-12.
30. VAN RUMSTE, M.M., CUSTERS, I.M., VAN DER VEEN, F., VAN WELY, M., EVERS, J.L. and MOL, B.W. The influence of the number of follicles on pregnancy rates in intrauterine insemination with ovarian stimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update,* 2008, vol. 14, no. 6, s. 563-570.

31. KHALIL, M.R., RASMUSSEN, P.E., ERB, K., LAURSEN, S.B., REX, S. and WESTERGAARD, L.G. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand,* 2001, vol. 80, no. 1, s. 74-81.
32. TUR, R., BARRI, P.N., COROLEU, B., BUXADERAS, R., MARTINEZ, F. and BALASCH, J. Risk factors for high-order multiple implantation after ovarian stimulation with gonadotrophins: evidence from a large series of 1878 consecutive pregnancies in a single centre. *Hum Reprod*, 2001, vol. 16, no. 10, s. 2124-2129.
33. WANG, C.F. and GEMZELL, C. The use of human gonadotropins for the induction of ovulation in women with polycystic ovarian disease. *Fertil Steril*, 1980, vol. 33, no. 5, s. 479-486.
34. HOMBURG, R. and HOWLES, C.M. Low-dose FSH therapy for anovulatory infertility associated with polycystic ovary syndrome: rationale, results, reflections and refinements. *Hum Reprod Update*, 1999, vol. 5, no. 5, s. 493-499.
35. HAMILTON-FAIRLEY, D. and FRANKS, S. Common problems in induction of ovulation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1990, vol. 4, no. 3, s. 609-625.
36. MCCLAMROCK, H.D., JONES, H.W. JR., and ADASHI, E.Y. Ovarian stimulation and intrauterine insemination at the quarter centennial: implications for the multiple births epidemic. *Fertil Steril*, 2012, vol. 97, no. 4, s. 802-809.
37. RAGNI, G., CALIARI, I., NICOLOSI, A.E., ARNOLDI, M., SOMIGLIANA, E. and CROSIGNANI, P.G. Preventing high-order multiple pregnancies during controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination: 3 years' experience using low-dose recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril*, 2006, vol. 85, no. 3, s. 619-624.
38. BALASCH, J. Gonadotrophin ovarian stimulation and intrauterine insemination for unexplained infertility. *Reprod Biomed Online*, 2004, vol. 9, no. 6, s. 664-672.
39. DELVIGNE, A. and ROZENBERG, S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update*, 2002, vol. , no. 6, s. 559-577.
40. DELVIGNE, A. and ROZENBERG, S. Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Hum Reprod Update*, 2003, vol. 9, no. 1, s. 77-96.
41. GUZICK, D.S., CARSON, S.A., COUTIFARIS, C., OVERSTREET, J.W., FACTOR-LITVAK, P., STEINKAMPF, M.P., HILL, J.A., MASTROIANNI, L., BUSTER, J.E., NAKAJIMA, S.T., VOGEL, D.L. and CANFIELD, R.E. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med*, 1999, vol. 340, no. 3, s. 177-183.
42. DANKERT, T., KREMER, J.A., COHLEN, B.J., HAMILTON, C.J., PASKER-DE JONG, P.C., STRAATMAN, H. and VAN DOP, P.A. A randomized clinical trial of clomiphene citrate versus low dose recombinant FSH for ovarian hyperstimulation in intrauterine insemination cycles for nexplained and male subfertility. *Hum Reprod,* 2007, vol. 22, no. 3, s. 792-797.

43. LEADER, A. and GROUP for MONOFOLLICULAR OVULATION INDUCTION STUDY, Improved monofollicular ovulation in anovulatory or oligo-ovulatory women after a low-dose step-up protocol with weekly increments of 25 international units of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril*, 2006. 85(6): p. 1766-1773.
44. BALEN, A. Ovulation induction--optimizing results and minimizing risks. *Hum Fertil* (Camb), 2003, vol. 6, no. Suppl 1, s. S42-51.
45. MESSINIS, I.E. Ovulation induction: a mini review. *Hum Reprod*, 2005, vol. 20, no. 10, s. 2688-2697.
46. PLATTEAU, P., ANDERSEN, A.N., BALEN, A., DEVROEY, P., SORENSEN, P., HELMGAARD, L., ARCE, J.C. and GROUP MENOPUR OVULATION INDUCTION STUDY, Similar ovulation rates, but different follicular development with highly purified menotrophin compared with recombinant FSH in WHO Group II anovulatory infertility: a randomized controlled study. *Hum Reprod,* 2006, vol. 21, no. 7, s. 1798-1804.
47. BALEN, A., PLATTEAU, P., ANDERSEN, A.N., DEVROEY, P., HELMGAARD, L., ARCE, J.C. and GROUP FOR THE BRAVELLE OVULATION INDUCTION STUDY, Highly purified FSH is as efficacious as recombinant FSH for ovulation induction in women with WHO Group II anovulatory infertility: a randomized controlled non-inferiority trial. *Hum Reprod*, 2007, vol. 22, no. 7, s. 1816-1823.
48. REINDOLLAR, R.H. and GOLDMAN, M.B. Gonadotropin therapy: a 20th century relic. *Fertil Steril*, 201, vol. 97, no. 4, s. 813-818.
49. ABOULGHAR, M. Prediction of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). Estradiol level has an important role in the prediction of OHSS. *Hum Reprod*, 2003, vol. 18, no. 6, s. 1140-1141.
50. PENZIAS, A.S. Improving results with assisted reproductive technologies: individualized patient-tailored strategies for ovulation induction. *Reprod Biomed Online*, 2004, vol. 9, no. 1, s. 43-46.
51. LA COUR FREIESLEBEN, N., LOSSL, K., BOGSTAD, J., BREDKJAER, H.E., TOFT, B., ROSENDAHL, M., LOFT, A., BANGSBOLL, S., PINBORG, A. and NYBOE ANDERSEN, A. Individual versus standard dose of rFSH in a mild stimulation protocol for intrauterine insemination: a randomized study. *Hum Reprod,* 2009, vol. 24, no. 10, s. 2523-2530.
52. FIEDLER, K. and EZCURRA, D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, vol. 10, s. 32.
53. OLIVENNES, F., HOWIES, C.M., BORINI, A., GERMOND, M., TREW, G., WIKLAND, M., ZEGERS-HOCHSCHILD, F., SAUNDERS, H. and ALAM, V. Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm: the CONSORT study. *Reprod Biomed Online*, 2011, vol. 22, no. Suppl 1, s. S73-82.
54. AITTOMAKI, K., LUCENA, J.L., PAKARINEN, P., SISTONEN, P., TAPANAINEN, J., GROMOLL, J., KASKIKARI, R., SANKILA, E.M., LEHVASLAIHO, H., ENGEL, A.R., NIESCHLAG, E., HUHTANIEMI, I. and DE LA CHAPELLE, A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 1995, vol. 82, no. 6, s. 959-968.
55. PEREZ MAYORGA, M., GROMOLL, J., BEHRE, H.M., GASSNER, C., NIESCHLAG, E. and SIMONI, M. Ovarian response to follicle-stimulating

hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, vol. 85, no. 9, s. 3365-3369.
56. DE LEENER, A., MONTANELLI, L., VAN DURME, J., CHAE, H., SMITS, G., VASSART, G. and COSTAGLIOLA, S. Presence and absence of follicle-stimulating hormone receptor mutations provide some insights into spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome physiopathology. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, vol. 91, no. 2, s. 555-562.
57. GROMOLL, J., SIMONI, M., NORDHOFF, V., BEHRE, H.M., DE GEYTER, C. and NIESCHLAG, E. Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, vol. 125, no. 1-2, s. 177-182.
58. SIMONI, M., NIESCHLAG, E. and GROMOLL, J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update*, 2002, vol. 8, no. 5, s. 413-421.
59. LOUTRADIS, D., PATSOULA, E., MINAS, V., KOUSSIDIS, G.A., ANTSAKLIS, A., MICHALAS, S. and MAKRIGIANNAKIS, A. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *J Assist Reprod Gene*t, 2006, vol. 23, no. 4, s. 177-184.
60. JOHNSON, M.H. *Essential Reproduction*. 6. vyd. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 316 s. ISBN 978-1-4051-1866-8 Kapitola 3, Reproductive Messengers, s. 37- 59.
61. ADASHI, E.Y., ROCK, J.A., ROSENWAKS, Z. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. 1. vyd. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, 1206 s. ISBN 0-7817-0203-8 Kapitola 2, The Ovarian Follicular Apparatus, s. 17- 40.
62. NELSON, S.M., TELFER, E.E. and ANDERSON, R.A. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update,* 2013, vol. 19, no. 1, s. 67-83.
63. FAUSER, B.C. and VAN HEUSDEN, A.M. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*, 1997, vol. 18, no. 1, s. 71-106.
64. OTSUKA, F., MCTAVISH, K.J. and SHIMASAKI, S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev*, 2011, vol. 78, no. 1, s. 9-21.
65. HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, 1999, vol. 124, s. 43-101.
66. BALASH, J. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 3. vydání editor GARDNER, D.K., WEISSMAN, A., HOWLES, C., SHOHAM, Z. London: Martin Dunitz, 2009, 912 s. ISBN 978-0-415-44894-9, Kapitola 37, The role of FSH and LH in ovulation induction: current concepts, s. 489-511.
67. RICHARDS, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev*, 1980, vol. 60, no. 1, s. 51-89.
68. RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*, 1994, vol. 15, no. 6, s. 725-751.
69. MACKLON, N.S., STOUFFER, R.L. GIUDICE, L.C. and FAUSER, B.C. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev*, 2006, vol. 27, no. 2, s. 170-207.

70. BAERWALD, A.R., ADAMS, G.P. and PIERSON, R.A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update*, 2012, vol. 18, no. 1, s. 73 -91.
71. BARNETT, K.R., SCHILLING, C., GREENFELD, C.R., TOMIC, D. and FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*, 2006, vol. 12, no. 5, s. 537-555.
72. RUSSELL, D.L. and ROBKER, R.L. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*, 2007, vol. 13, no. 3, s. 289-312.
73. FILICORI, M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril*, 1999, vol. 71, no. 3, s. 405-414.
74. KUMANOV, P., NANDIPATI, K.C., TOMOVA, A., ROBEVA, R. and AGARWAL, A. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed Online*, 2005, vol. 10, no. 6, s. 786-812.
75. CHAND, A.L., HARRISON, C.A. and SHELLING, A.N. Inhibin and premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 39-50.
76. *Clipart Top 100* [online]. Rok publikování 2013, poslední revize 28.1.2013 [cit. 2013-01-28]. Dostupné z: < http://www.cliparttop100.com>.
77. KNIGHT, P.G. and GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 2006, vol. 132, no. 2, s. 191-206.
78. OKTEM, O. and URMAN, B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod,* 2010, vol. 25, no. 12, s. 2944-2954.
79. DURLINGER, A.L., VISSER, J.A. and THEMMEN, A.P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*, 2002, vol. 124, no. 5, s. 601-609.
80. BROWN, J.B. Pituitary control of ovarian function--concepts derived from gonadotrophin therapy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 1978, vol. 18, no. 1, s. 46-54.
81. DICKEY, R.P. and HOLTKAMP, D.E. Development, pharmacology and clinical experience with clomiphene citrate. *Hum Reprod Update,* 1996, vol. 2, no. 6, s. 483-506.
82. SHOHAM, Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 3. vydání editor GARDNER, D.K., WEISSMAN, A., HOWLES, C., SHOHAM, Z. London: Martin Dunitz, 2009, 912 s. ISBN 978-0-415-44894-9, Kapitola 36, Drug used for controlled ovarian stimulation: clomiphen citrate and gonadotropins, s. 469-489.
83. TRIWITAYAKORN, A., SUWAJANAKORN, S., TRIRATANACHAT, S., SAMPATANUKUL, P., PRUKSANANONDA, K. and SEREEPAPONG, W. Effects of initiation day of clomiphene citrate on the endometrium of women with regular menstrual cycles. *Fertil Steril,* 2002, vol. 78, no. 1, s. 102-107.
84. KYROU, D., FATEMI, H.M., TOURNAYE, H. and DEVROEY, P. Luteal phase support in normo-ovulatory women stimulated with clomiphene citrate for intrauterine insemination: need or habit? *Hum Reprod,* 2010, vol. 25, no. 10, s. 2501-2506.
85. BERKER, B., KAHRAMAN, K., TASKIN, S., SUKUR, Y.E., SONMEZER, M. and ATABEKOGLU, C.S. Recombinant FSH versus clomiphene citrate for ovarian stimulation in couples with unexplained infertility and male

subfertility undergoing intrauterine insemination: a randomized trial. *Arch Gynecol Obstet*, 2011, vol. 284, no. 6, s. 1561-1566.
86. NAHUIS, M., VAN DER VEEN, F., OOSTERHUIS, J., MOL, B.W., HOMPES, P. and VAN WELY, M. Review of the safety, efficacy, costs and patient acceptability of recombinant follicle-stimulating hormone for injection in assisting ovulation induction in infertile women. *In J Womens Health*, 2010, no. 1, s. 205-211.
87. FAUSER, B.C. Developments in human recombinant follicle stimulating hormone technology: are we going in the right direction? *Hum Reprod*, 1998, vol. 13, no. Suppl 3, s. 36-46; discussion 47-51.
88. RODGERS, M., MCLOUGHLIN, J.D., LAMBERT, A., ROBERTSON, W.R. and MITCHELL, R. Variability in the immunoreactive and bioactive follicle stimulating hormone content of human urinary menopausal gonadotrophin preparations. *Hum Reprod,* 1995, vol. 10, no. 8, s. 1982-1986.
89. CORTVRINDT, R., HU, Y. and SMITZ, J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod,* 1998, vol. 13, no. 5, s. 1292-1302.
90. LA MARCA, A., ARGENTO, C., SIGHINOLFI, G., GRISENDI, V., CARBONE, M., D'IPPOLITO, G., ARTENISIO, A.C., STABILE, G. and VOLPE, A. Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, vol. 13, no. 3, s. 398-408.
91. SILLS, E.S., ALPER, M.M. and WALSH, A.P. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009, vol. 146, no. 1, s. 30-36.
92. VAN ROOIJ, I.A., BROEKMANS, F.J., TE VELDE, E.R., FAUSER, B.C., BANCSI, L.F., DE JONG, F.H. and THEMMEN, A.P. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*, 2002, vol. 17, no. 12, s. 3065-3071.
93. HANSEN, L.M., BATZER, F.R., GUTMANN, J.N., CORSON, S.L., KELLY, M.P. and GOCIAL, B. Evaluating ovarian reserve: follicle stimulating hormone and oestradiol variability during cycle days 2-5. *Hum Reprod*, 1996, vol. 11, no. 3, s. 486-489.
94. KWEE, J., SCHATS, R., MCDONNELL, J., LAMBALK, C.B. and SCHOEMAKER, J. Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod,* 2004, vol. 19, no. 3, s. 590-595.
95. BROEKMANS, F.J., KWEE, J., HENDRIKS, D.J., MOL, B.W. and LAMBALK, C.B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*, 2006, vol. 12, no. 6, s. 685-718.
96. FANCHIN, R., SCHONAUER, L.M., RIGHINI, C., GUIBOURDENCHE, J., FRYDMAN, R. and TAIEB, J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod,* 2003, vol. 18, no. 2, s. 323-327.
97. HAMPL, R., ŠNAJDEROVÁ, M. and MARDEŠIČ, T. Antimullerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiol Res*, 2011, vol. 60, no. 2, s. 217-223.
98. LA MARCA, A., SIGHINOLFI, G., RADI, D., ARGENTO, C., BARALDI, E., ARTENISIO, A.C., STABILE, G. and VOLPE, A. Anti-Mullerian

hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*, 2010,, vol. 16, no. 2, s. 113-130.
99. ANDERSON, R.A., NELSON, S.M. and WALLACE, W.H. Measuring anti-Mullerian hormone for the assessment of ovarian reserve: when and for whom is it indicated? *Maturitas*, 2012, vol. 71,, no. 1, s. 28-33.
100. KUNT, C., OZAKSIT, G., KESKIN KURT, R., CAKIR GUNGOR, A.N., KANAT-PEKTAS, M., KILIC, S. and DEDE, A. Anti-Mullerian hormone is a better marker than inhibin B, follicle stimulating hormone, estradiol or antral follicle count in predicting the outcome of in vitro fertilization. *Arch Gynecol Obstet*, 2011, vol. 283, no. 6, s. 1415-1421.
101. BROER, S.L., DOLLEMAN, M., OPMEER, B.C., FAUSER, B.C., MOL, B.W. and BROEKMANS, F.J. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2011, vol. 17, no. 1, s. 46-54.
102. ELDAR-GEVA, T., BEN-CHETRIT, A., SPITZ, I.M., RABINOWITZ, R., MARKOWITZ, E., MIMONI, T., GAL, M., ZYLBER-HARAN, E. and MARGALIOTH, E.J. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod*, 2005, vol. 20, no. 11, s. 3178-3183.
103. LI, H.W., NG, E.H., WONG, B.P., ANDERSON, R.A., HO, P.C. and YEUNG, W.S. Correlation between three assay systems for anti-Mullerian hormone (AMH) determination. *J Assist Reprod Genet*, 2012, vol. 29, no. 12, s. 1443-1446.
104. ARICI, A., BYRD, W., BRADSHAW, K., KUTTEH, W.H., MARSHBURN, P. and CARR, B.R. Evaluation of clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin treatment: a prospective, randomized, crossover study during intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril,* 1994, vol. 61, no. 2, s. 314-318.
105. HENDRIKS, D.J., KWEE, J., MOL, B.W., TE VELDE, E.R. and BROEKMANS, F.J. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril,* 2007, vol. 87, no. 4, s. 764-775.
106. NAVOT, D., ROSENWAKS, Z. and MARGALIOTH, E.J. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet*, 1987, vol. 2, no. 8560, s. 645-647.
107. LOUMAYE, E., BILLION, J.M., MINE, J.M., PSALTI, I., PENSIS, M. and THOMAS, K. Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril*, 1990, vol. 53, no. 2, s. 295-301.
108. WINSLOW, K.L., TONER, J.P., BRZYSKI, R.G., OEHNINGER, S.C., ACOSTA, A.A. and MUASHER, S.J. The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test--a sensitive predictor of performance in the flare-up in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril*, 1991, vol. 56, no. 4, s. 711-717.
109. FANCHIN, R., DE ZIEGLER, D., OLIVENNES, F., TAIEB, J., DZIK, A. and FRYDMAN, R. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting 'poor responders' in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1994, vol. 9, no. 9, s. 1607-1611.
110. SKIADAS, C.C., DUAN, S., CORRELL, M., RUBIO, R., KARACA, N., GINSBURG, E.S., QUACKENBUSH, J. and RACOWSKY, C. Ovarian reserve status in young women is associated with altered gene expression

in membrana granulosa cells. *Mol Hum Reprod,* 2012, vol. 18, no. 7, s. 362-371.
111. GREENSEID, K., JINDAL, S., HURWITZ, J., SANTORO, N. and PAL, L. Differential granulosa cell gene expression in young women with diminished ovarian reserve. *Reprod Sci,* 2011, vol. 18, no. 9, s. 892-899.
112. JINDAL, S., GREENSEID, K., BERGER, D., SANTORO, N. and PAL, L. Impaired gremlin 1 (GREM1) expression in cumulus cells in young women with diminished ovarian reserve (DOR). *J Assist Reprod Genet,* 2012, vol. 29, no. 2, s. 159-162.
113. BOSCH, E. and EZCURRA, D. Individualised controlled ovarian stimulation (iCOS): maximising success rates for assisted reproductive technology patients. *Reprod Biol Endocrinol,* 2011, no. 9, s. 82.
114. NYBOE ANDERSEN, A., BALEN, A., PLATTEAU, P., DEVROEY, P., HELMGAARD, L., ARCE, J.C. and Group BRAVELLE OVULATION INDUCTION STUDY, Predicting the FSH threshold dose in women with WHO Group II anovulatory infertility failing to ovulate or conceive on clomiphene citrate. *Hum Reprod,* 2008, vol. 23, no. 6, s. 1424-1430.
115. HUGUES, J.N., CEDRIN-DURNERIN, I., HOWLES, C.M. The use of a decremental dose regimen in patients treated with a chronic low-dose step-up protocol for WHO Group II anovulation: a prospective randomized multicentre study. *Hum Reprod,* 2006, vol. 21, no. 11, s. 2817-2822.
116. FAUSER, B.C., DE JONG, D., OLIVENNES, F., WRAMSBY, H., TAY, C., ITSKOVITZ-ELDOR, J. and VAN HOOREN, H.G. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, vol. 87, no. 2, s. 709-715.
117. WEISSMAN, A., LURIE, S., ZALEL, Y., GOLDCHMIT, R. and SHOHAM, Z. Human chorionic gonadotropin: pharmacokinetics of subcutaneous administration. *Gynecol Endocrinol,* 1996, vol. 10, no. 4, s. 273-276.
118. ALLAHBADIA, G.N. *Intrauterine insemination.* 1. vyd. 2005, New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers. s. 455. ISBN1 84214 3220, s. 1-3.
119. PATTON, P.E., BURRY, K.A., THURMOND, A., NOVY, M.J. and WOLF, D.P. Intrauterine insemination outperforms intracervical insemination in a randomized, controlled study with frozen, donor semen. *Fertil Steril*, 1992, vol. 57, no. 3, s. 559-564.
120. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5. vyd. 2010, New York: World Health Organization. s. 260 ISBN 978-92-4-154778-9.
121. ZEYNELOGLU, H.B., ARICI, A., OLIVE, D.L. and DULEBA, A.J. Comparison of intrauterine insemination with timed intercourse in superovulated cycles with gonadotropins: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 1998, vol. 69, no. 3, s. 486-491.
122. COSTELLO, M.F. Systematic review of the treatment of ovulatory infertility with clomiphene citrate and intrauterine insemination. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2004, vol. 44, no. 2, s. 93-102.
123. SCHWARTZ, D. and MAYAUX, M.J. Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. Federation CECOS. *N Engl J Med,* 1982, vol. 306, no. 7, s. 404-406.

124. PLOSKER, S.M., JACOBSON, W. and AMATO, P. Predicting and optimizing success in an intra-uterine insemination programme. *Hum Reprod*, 1994, vol. 9, no. 11, s. 2014-2021.
125. KHALIL, M.R., RASMUSSEN, P.E., ERB, K., LAURSEN, S.B., REX, S. and WESTERGAARD, L.G. Intrauterine insemination with donor semen. An evaluation of prognostic factors based on a review of 1131 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2001, vol. 80, no. 4, s. 342-348.
126. PEARLSTONE, A.C., FOURNET, N., GAMBONE, J.C., PANG, S.C. and BUYALOS, R.P. Ovulation induction in women age 40 and older: the importance of basal follicle-stimulating hormone level and chronological age. *Fertil Steril,* 1992, vol. 58, no. 4, s. 674-679.
127. AGHA-HOSSEINI, M., RAHMANI, M., ALLEYASSIN, A., SAFDARIAN, L. and SARVI, F. The effect of progesterone supplementation on pregnancy rates in controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination cycles: a randomized prospective trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,* 2012, vol. 165, no. 2, s. 249-253.
128. PENZIAS, A.S. and ALPER, M.M. Luteal support with vaginal micronized progesterone gel in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, 2003, vol. 6, no. 3, s. 287-295.
129. MARTINEZ, A.R., BERNARDUS, R.E., VERMEIDEN, J.P. and SCHOEMAKER, J. Basic questions on intrauterine insemination: an update. *Obstet Gynecol Surv,* 1993, vol. 48, no. 12, s. 811-828.
130. CAMPANA, A., SAKKAS, D., STALBERG, A., BIANCHI, P.G., COMTE, I., PACHE, T. and WALKER, D. Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod*, 1996, vol. 11, no. 4, s. 732-736.
131. BALASCH, J., BALLESCA, J.L., PIMENTEL, C., CREUS, M., FABREGUES, F. and VANRELL, J.A. Late low-dose pure follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in intra-uterine insemination cycles. *Hum Reprod*, 1994, vol. 9, no. 10, s. 1863-1866.
132. COELINGH BENNINK, H.J., FAUSER, B.C. and OUT, H.J. Recombinant follicle-stimulating hormone (FSH; Puregon) is more efficient than urinary FSH (Metrodin) in women with clomiphene citrate-resistant, normogonadotropic, chronic anovulation: a prospective, multicenter, assessor-blind, randomized, clinical trial. European Puregon Collaborative Anovulation Study Group. *Fertil Steril,* 1998, vol. 69, no. 1, s. 19-25.
133. YARALI, H., BUKULMEZ, O. and GURGAN, T. Urinary follicle-stimulating hormone (FSH) versus recombinant FSH in clomiphene citrate-resistant, normogonadotropic,chronic anovulation: a prospective randomized study. *Fertil Steril*, 1999, vol. 72, no. 2, s. 276-281.
134. GERLI, S., CASINI, M.L., UNFER, V., COSTABILE, L., BINI, V. and DI RENZO, G.C. Recombinant versus urinary follicle-stimulating hormone in intrauterine insemination cycles: a prospective, randomized analysis of cost effectiveness. *Fertil Steril,* 2004, vol. 82, no. 3, s. 573-578.
135. DEMIROL, A. and GURGAN, T. Comparison of different gonadotrophin preparations in intrauterine insemination cycles for the treatment of unexplained infertility: a prospective, randomized study. *Hum Reprod*, 2007, vol. 22, no. 1, s. 97-100.

136. SAGNELLA, F., MORO, F., LANZONE, A., TROPEA, A., MARTINEZ, D., CAPALBO, A., GANGALE, M.F., SPADONI, V., MORCIANO, A. and APA, R. A prospective randomized noninferiority study comparing recombinant FSH and highly purified menotropin in intrauterine insemination cycles in couples with unexplained infertility and/or mild-moderate male factor. *Fertil Steril,* 2011, vol. 95, no. 2, s. 689-694.
137. DAYA, S. and GUNBY, J. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Hum Reprod*, 1999, vol. 14, no. 9, s. 2207-2215.
138. MATORRAS, R., OSUNA, C., EXPOSITO, A., CRISOL, L. and PIJOAN, J.I. Recombinant FSH versus highly purified FSH in intrauterine insemination: systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*, 2011, vol. 95, no. 6, s. 1937-1942, 1942 e1931-1933.
139. ISAZA, V., REQUENA, A., GARCIA-VELASCO, J.A., REMOHI, J., PELLICER, A. and SIMON, C. Recombinant vs. urinary follicle-stimulating hormone in couples undergoing intrauterine insemination. A randomized study. *J Reprod Med,* 2003, vol. 48, no. 2, s. 112-118.
140. BLICKSTEIN, I. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 3. vydání editor GARDNER, D.K., WEISSMAN, A., HOWLES, C., SHOHAM, Z. London: Martin Dunitz, 2009, 912 s. ISBN 978-0-415-44894-9, Kapitola 59, Iatrogenic multiple pregnancy: the risk of ART, p. 795- 806.
141. CROSIGNANI, P.G., SOMIGLIANA, E. and GROUP INTRAUTERINE INSEMINATION STUDY, Effect of GnRH antagonists in FSH mildly stimulated intrauterine insemination cycles: a multicentre randomized trial. *Hum Reprod,* 2007, vol. 22, no. 2, s. 500-505.
142. DICKEY, R.P. Strategies to reduce multiple pregnancies due to ovulation stimulation. *Fertil Steril,* 2009, vol. 91, no. 1, s. 1-17.
143. GOLAN, A., RON-EL, R., HERMAN, A., SOFFER, Y., WEINRAUB, Z. and CASPI, E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv*, 1989, vol. 44, no. 6, s. 430-440.
144. MATHUR, R.S., AKANDE, A.V., KEAY, S.D., HUNT, L.P. and JENKINS, J.M. Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril,* 2000, vol. 73, no. 5, s. 901-907.
145. LUDWIG, M., GEMBRUCH, U., BAUER, O. and DIEDRICH, K. Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in a spontaneous pregnancy with fetal and placental triploidy: information about the general pathophysiology of OHSS. *Hum Reprod,* 1998, vol. 13, no. 8, s. 2082-2087.
146. DIETERICH, M., BOLZ, M., REIMER, T., COSTAGLIOLA, S. and GERBER, B. Two different entities of spontaneous ovarian hyperstimulation in a woman with FSH receptor mutation. *Reprod Biomed Online*, 2010, vol. 20, no. 6, s. 751-758.
147. MEDURI, G., BACHELOT, A., COCCA, M.P., VASSEUR, C., RODIEN, P., KUTTENN, F., TOURAINE, P. and MISRAHI, M. Molecular pathology of the FSH receptor: new insights into FSH physiology. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, vol. 282, no. 1-2, s. 130-142.
148. RIZK, B. and SMITZ, J. Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRH agonists for IVF and related procedures. *Hum Reprod,* 1992, vol. 7, no. 3, s. 320-327.

149. CORSON, S.L., BATZER, F.R., GOCIAL, B. and MAISLIN, G. Intrauterine insemination and ovulation stimulation as treatment of infertility. *J Reprod Med,* 1989, vol. 34, no. 6, s. 397-406.

Přílohy

Seznam tabulek

Tabulka 1: Porovnání obsahu FSH a LH v gonadotropinech..... 40
Tabulka 2: Randomizované studie – srovnání klomifencitrátu a rekombinantních gonadotropinů společně s intrauterinní inseminací..... 57
Tabulka 3: Randomizované studie – srovnání urinárních a rekombinantních gonadotropinů v indukci ovulace bez intrauterinní inseminace..... 58
Tabulka 4: Randomizované studie – indukce ovulace gonadotropiny společně s intrauterinní inseminací..... 59
Tabulka 5: Základní charakteristiky pacientek..... 71
Tabulka 6: Příčiny neplodnosti..... 72
Tabulka 7: Hormonální charakteristiky pacientek..... 73
Tabulka 8: Charakteristiky cyklů..... 74
Tabulka 9. Důvody pro zrušení cyklů..... 75
Tabulka 10. Výsledky léčby..... 76
Tabulka 11. Komplikace léčby..... 77

Seznam grafů

Graf č.1 Zastoupení příčin neplodnosti dle CDC z roku 2004..... 9
Graf č.2 Regionální přispění cyklů mimotělního oplodnění v roce 2003 do celosvětového registru cyklů asistované reprodukce..... 12
Graf č.3 Závislost rizika dvojčetného těhotenství na výběru metody asistované reprodukce..... 62

Seznam obrázků

Obr. č. 1 Ultrazvukový obraz mono-folikulárního vývoje.....15
Obr. č. 2 Alelické varianty FSH receptoru na exonu 10.....17
Obr. č. 3 Preantrální a antrální stádium vývoje folikulů..... 22
Obr. č. 4 FSH receptor v kumulárních buňkách myší..... 26
Obr. č. 5 LH receptor v buňkách granulózy u myší..... 27
Obr. č. 6 Model transgenních myší..... 30
Obr. č 7 Přehledné zobrazení faktorů zahrnutých v řízení folikulogeneze..... 31
Obr. č. 8 Signálové interakce ve vývoji primárního folikulu..... 32
Obr. č. 9 Signálové interakce ve vývoji sekundárního folikulu..... 34
Obr. č. 10 Intraovariální signálové interakce mezi buňkami granulózy a théky..... 35
Obr. č. 11 „FSH threshold“ a „FSH window“ 37
Obr. č. 12 Mechanismus účinku AMH..... 44
Obr. č. 13 Vliv věku a menstruačního cyklu na koncentraci AMH u mladých žen.... 45
Obr. č. 14 Ultrazvukový obraz antrálních folikulů pro měření AFC..... 46
Obr. č. 15 Ultrazvukový průkaz dvojčetného těhotenství..... 63
Obr. č. 16 Ultrazvukový nález zvětšených vaječníků při OHSS..... 64
Obr. č. 17 Ultrazvukový průkaz těhotenství společně mírným projevem OHSS.....65
Obr. č. 18 Ultrazvukový obraz probíhajícího jednočetného těhotenství..... 85