

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

VLIV KVALITY SPERMIOGRAMU NA *IN VITRO*
FERTILIZACI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Konzultanti: MUDr. Libor Hradecký, Ph.D.
MUDr. Jitka Zemanová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

LUKÁŠ GOLD

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucí práce RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, jak při tvorbě práce, tak i při její celkové úpravě. Další poděkování patří mým konzultantům MUDr. Liborovi Hradeckému, Ph.D. a MUDr. Jitce Zemanové za cenné odborné rady. Rád bych také poděkoval všem mým kolegům a spolupracovníkům z embryologické a andrologické laboratoře IVF Zentren Prof. Zech, s.r.o., kteří mě přivedli k tomuto laboratornímu oboru. V poslední řadě bych rád poděkoval celé své rodině za velikou podporu během celého studia.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 19. 4. 2016

Podpis

OBSAH

OBSAH	1
ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
SEZNAM ZKRATEK	5
1 ÚVOD	7
2 ZADÁNÍ PRÁCE – CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	8
3 TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 Spermatogenese.....	9
3.2 Hormonální regulace spermatogenese	10
3.3 Morfologie spermií.....	11
3.3.1 Stavba spermie	11
3.4 Odchytky v morfologii spermií	12
3.4.1 Odchytky v morfologii hlavičky	12
3.4.2 Odchytky v morfologii krčku a střední části	13
3.4.3 Odchytky v morfologii bičíku.....	14
3.5 Nejčastější příčiny ovlivňující kvalitu spermogramu	14
3.5.1 Věk.....	14
3.5.2 Genetické příčiny	14
3.5.3 Vliv prostředí	15
4 ZÁKLADNÍ TECHNIKY ASISTOVANÉ REPRODUKCE	16
4.1 Hormonální stimulace ovárií.....	16
4.2 Odběr oocytů (ovum pick – up, OPU)	16
4.3 Denudace oocytů.....	17
4.4 Analýza a zpracování ejakulátu	19
4.4.1 Provedení spermogramu	20
4.5 Zpracování ejakulátu	22
4.6 Metody oplození <i>in vitro</i>	24
4.6.1 Fertilizace <i>in vitro</i>	24
4.7 Kultivace a hodnocení embryí	24
4.7.1 Hodnocení jednotlivých stádií embryí.....	25
4.8 Asistovaný hatching	30
4.8.1 Laserový AH.....	30
4.9 Transfer embryí – embryotransfer	31
5 PRAKTICKÁ ČÁST	33

5.1	Materiál a metodiky	33
5.2	Intracytoplasmatická injekce spermie	33
5.3	Intracytoplasmatická injekce morfologicky selektované spermie	35
5.4	Hodnocené parametry	38
5.5	Popis statistických metod	38
6	VÝSLEDKY	39
7	DISKUZE	46
8	ZÁVĚR	48
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	49
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	53
11	SEZNAM TABULEK.....	54
12	PŘÍLOHY	55

ABSTRAKT

Vliv kvality spermioqramu na *in vitro* fertilizaci

Diplomová práce

Autor: Bc. Lukáš Gold

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Počet párů, které mají problém s otěhotněním se zvyšuje každým rokem. Někdy pomůže úprava životního stylu, zmírnění životního tempa. V jiných případech však musí páry využít služeb asistované reprodukce. U některých párů je neplodnost způsobená pouze jedním faktorem, u dalších se faktory kombinují. Cílem této diplomové práce bylo vyhodnocení otázky, zda kvalita spermioqramu ovlivňuje kvalitu mimotělního oplození. Zároveň bylo cílem vyhodnotit jaká technika aktivního oplození oocytu injekcí spermie (intracytoplasmatická injekce spermie, ICSI nebo intracytoplasmatická injekce morfologicky selektované spermie, IMSI) má vyšší úspěšnost na fertilizaci *in vitro*.

Pro získání našich dat a výsledků bylo v práci využito 100 párů, které na klinice Zentren Prof. Zech – Pilsen, s.r.o. podstoupily terapii pomocí darovaných oocytů. Do práce byli zařazeni muži, u kterých jsme v den odběru oocytů ovariální punkcí měli k dispozici čerstvý ejakulát. Spermii získanými z ejakulátu byly mikromanipulačně oplozeny darované oocyty. Muži byli podle výsledku spermioqramu rozděleni na kontrolní skupinu s normálním spermioqramem a skupinu sledovanou s patologickými hodnotami ve spermioqramu. Oocyty dáreků jsme do práce zahrnuli kvůli minimalizaci vlivu ženského faktoru.

Naše práce ukazuje, že vliv kvality spermioqramu na *in vitro* fertilizaci nebyl prokázán. Z toho tedy vyplývá, že základní andrologické vyšetření ejakulátu – spermioqram nemá pro aplikaci laboratorních metod asistované reprodukce výpovědní hodnotu. Při porovnání dvou různých mikromanipulačních technik pro oplození jsme nezjistili statisticky významný rozdíl.

Klíčová slova: spermioqram, spermie, ICSI, IMSI, *in vitro* fertilizace

ABSTRACT

Impact of spermiogram quality on *in vitro* fertilization

Diploma Thesis

Author: Bc. Lukáš Gold

Field of study: Specialist in laboratory methods

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Number of couples who have problems with becoming pregnant increases every year. Sometimes, change of lifestyle or alleviation of life tempo can help but in other cases couples have to use centre of assisted reproduction service. In some cases is infertility caused by only one factor, in other cases are factors combined. The aim of this work was the evaluation of question, if the spermiogram quality influences quality of artificial insemination. The secondary aim was to evaluate which technique of oocyte active insemination by injection (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI or Intracytoplasmic morphologically – selected sperm injection, IMSI) is more successful for fertilization *in vitro*.

Data and results were taken from 100 couples who underwent therapy using donated oocytes at Zentren Prof. Zech – Pilsen, s.r.o. clinic. Men who gave a fresh ejaculate in day of oocyte collection by ovarian puncture are included in this work. Donated oocytes were micromanipulatively impregnated by sperms which were taken from ejaculate. According to the spermiogram results men were divided into two groups. First one was control group with normal spermiogram results and the second one with pathological values in spermiogram. Donors oocytes are involved in the work to minimize the effect of female factors.

Our work shows, that impact of spermiogram quality on *in vitro* fertilization was not proved at all. It follows that basic andrologic semen analysis – spermiogram has not any value for application of methods of assisted reproduction. While comparing two different micromanipulative techniques for fertilization we did not find out any significant statistical difference.

Key words: spermiogram, sperm, ICSI, IMSI, *in vitro* fertilization

SEZNAM ZKRATEK

ABP	Androgeny vázající protein
AH	Asistovaný hatching
AMH	Anti – Mülleriánský hormon
ASP	Asthenozoospermie
ATSP	Asthenoteratozoospermie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ET	Embryotransfer
FBC	Časná blastocysta
FR	Fertilization rate
FSH	Folikuly stimulační hormon
GnRH	Gonadoliberin
hCG	Lidský choriový gonadotropin
ICSI	Intracytoplasmatická injekce spermie
IMSI	Intracytoplasmatická injekce morfologicky selektované spermie
IR	Implantation rate
IUI	Intrauterinní inseminace
IVF	<i>In vitro</i> fertilizace
LH	Luteinizační hormon
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NSP	Normozoospermie
OASP	Oligoasthenozoospermie
OATSP	Oligoasthenoteratozoospermie
OPU	Ovum – pick up
OSP	Oligozoospermie
OTSP	Oligoteratozoospermie
PICSI	Preselektovaná intracytolplasmatická injekce spermie
PP	Perivitelní prostor
PR	Pregnancy rate
ROS	Volné kyslíkové radikály
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SG	Spermgradient
SPG	Spermiogram
TSP	Teratozoospermie

UR	Utilization rate
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZP	Zona pellucida

1 ÚVOD

Po několikaletém úsilí lékařů z řady zemí na světě se v roce 1978 narodila Luisa Brown, první dítě po IVF (*in vitro* fertilizace) nebo jak se říká mezi veřejností „dítě ze zkumavky“. V tehdejším Československu se pomocí techniky *in vitro* fertilizace narodilo první dítě v roce 1982. Počet dětí narozených po metodách asistované reprodukce každoročně narůstá, v roce 2006 to bylo přes 4000 dětí.

Zjednodušený princip mimotělního oplození IVF není tak složitý: k odebranému oocytu z ovária přidáme suspenzi spermií a vzniklé embryo vrátíme do dělohy ženy. Techniky asistované reprodukce tedy nahrazují proces, který se odehrává ve vejcovodu. Úspěch těchto technik však vyžaduje velmi složitý proces, který začíná hormonální stimulací ženy vedoucí k zisku zralých oocytů přes jejich oplození v podmínkách *in vitro* až k embryotransferu.

Pro správné početí potomka je zapotřebí kvalitních spermií a oocytů, stejně jako hormonální řízení tohoto procesu. Mnoho současných studií upozorňuje na pomalý a však setrvalý proces zhoršování kvality ejakulátu v posledních několika desetiletích. Mužská neplodnost je multifaktoriálním syndromem zahrnujícím širokou škálu poruch.

Samotný andrologický faktor se podílí na problémech s plodností u každého šestého páru. Na příčině neplodnosti páru se podílí z 20 – 45 %. Proto při příchodu páru do centra asistované reprodukce je vedle vyšetření ženy zásadní i základní vyšetření ejakulátu – spermioqram (SPG).

2 ZADÁNÍ PRÁCE – CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit, zda kvalita spermiogramu má vliv na kvalitu *in vitro* oplození. Dalším cílem bylo porovnat, která z mikromanipulačních technik aktivního oplození oocytů (ICSI nebo IMSI) má lepší vliv na fertilizaci oocytů.

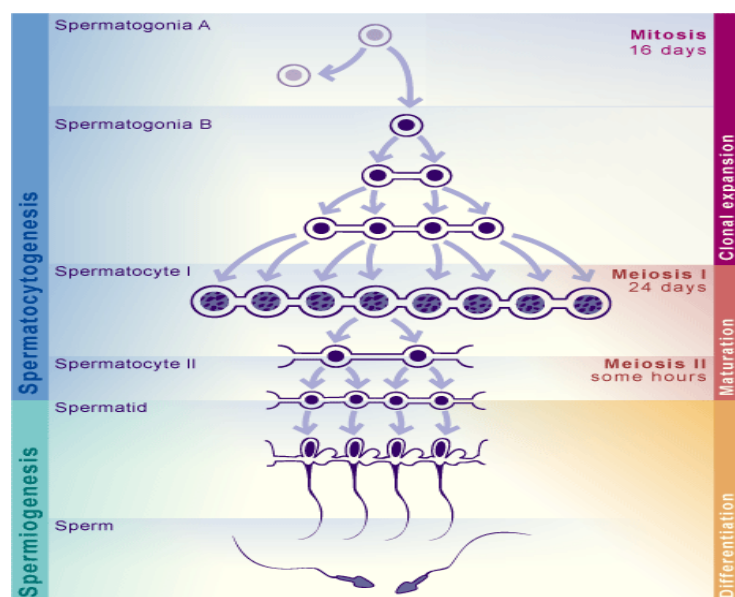
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Spermatogenese

Proces spermatogenese začíná v mužských varlatech počátkem puberty. Zahrnuje kompletní vývoj spermatogonií (bývalé primordiální zárodečné buňky) až ke spermii (viz. Obrázek 1, 2).

Tento proces lze rozdělit do tří fází: proliferace, redukční dělení (meióza) a diferenciaci. Proces spermatogenese je spojen se specifickými typy buněk – spermatogonie, spermatocyty a spermatidy. U mužů se začínají zárodečné buňky – spermatogonie množit s nástupem puberty. To je následováno meiózami a postupnou reorganizací buněčných složek, vyznačující se ztrátou cytoplasmy. [1, 2]

Kmenové buňky neboli spermatogonie A0 jsou umístěny ve spodní části intratubulárního prostoru semenotvorného kanálku. Po konečném mitotickém dělení (spermatogonií B) jsou primární spermatocyty přesunuty směrem k lumen kanálku. V tomto prostoru podstoupí 2 meiotická dělení na formu 2 sekundárních spermatocytů a 4 spermatid – časných stádií spermii. I když jádra spermatid obsahují haploidní sadu chromosomů, jsou neustále syntetizovány nízké hladiny rRNA, mRNA a proteinů. Tato prodloužená fáze terminální diferenciaci je známa jako spermiogenese. Během spermiogenese prochází spermatidy rozsáhlou přestavbou (nukleární kondenzace, tvorba akrosomu, tvorba bičíku a snížení obsahu cytoplasmy). Výsledkem tohoto složitého procesu je vznik zralé spermie schopné fertilizace – oplození. [1, 2, 3]



Obrázek 1: Průběh spermatogenese. *Převzato z:* [38]

3.2 Hormonální regulace spermatogenese

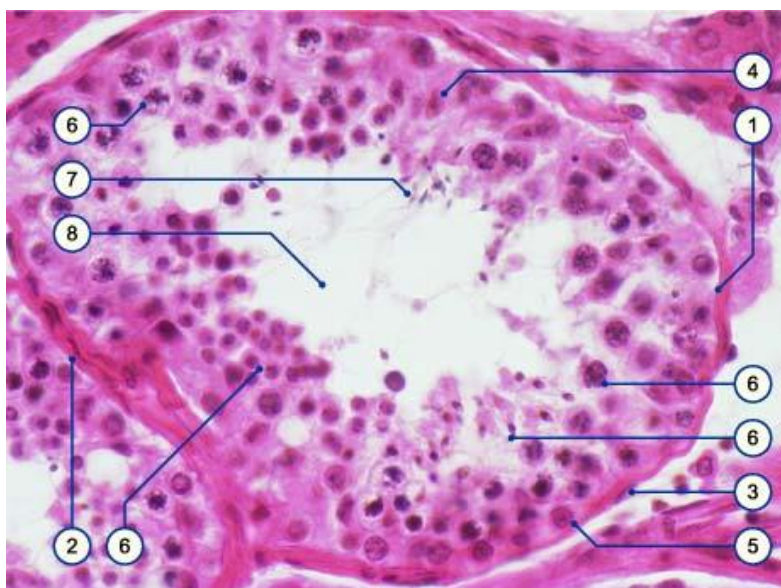
Správná funkce varlat je závislá na řadě hormonálních posílů působících na endokrinní a parakrinní systém.

Endokrinní intersticiální Leydigovy buňky se podílí především na tvorbě testosteronu a jeho uvolňování do krve a sousedních tkání. Produkce testosteronu je řízena luteinizačním hormonem (LH), který je vylučován předním lalokem hypofýzy. Dalším vylučovaným hormonem adenohipofýzy je folikuly stimulující hormon (FSH), který v první řadě působí na Sertoliho buňky. Hormon prolaktin ve své normální koncentraci zesiluje účinek LH na Leydigovy buňky. Tyto hormony jsou ovlivněny gonadoliberinem (GnRH), který vzniká v hypotalamu a do hypofýzy se dostává portálním oběhem. [4, 5]

Endokrinně aktivní jsou i Sertoliho buňky, které hrají ústřední roli v rozvoji funkčnosti varlete a tím i ve výrazu mužského fenotypu. Sertoliho buňky tvoří:

- Anti – Mülleriánský hormon (AMH), který v průběhu fetálního vývoje zajistí regresí Müllerových kanálků u plodu mužského pohlaví
- Estradiol, stimulující faktor spermatogenese
- Inhibin, který zabraňuje nadměrné sekreci FSH

Sertoliho buňky dále produkují androgeny vázající protein (ABP), který se podílí na udržování vysoké koncentrace testosteronu v tekutině, která vyplňuje semenotvorné kanálky. [4, 5, 6]



Obrázek 2: Histologická stavba semenotvorného kanálku. *Převzato z:* [39]

(1 Bazální membrána, 2 Myofibroblast, 3 Fibrocyt, 4 Sertoliho buňka, 5 Spermatogonie, 6 Různá stádia buněk v průběhu spermatogenese, 7 Spermie, 8 Lumen kanálku)

3.3 Morfologie spermií

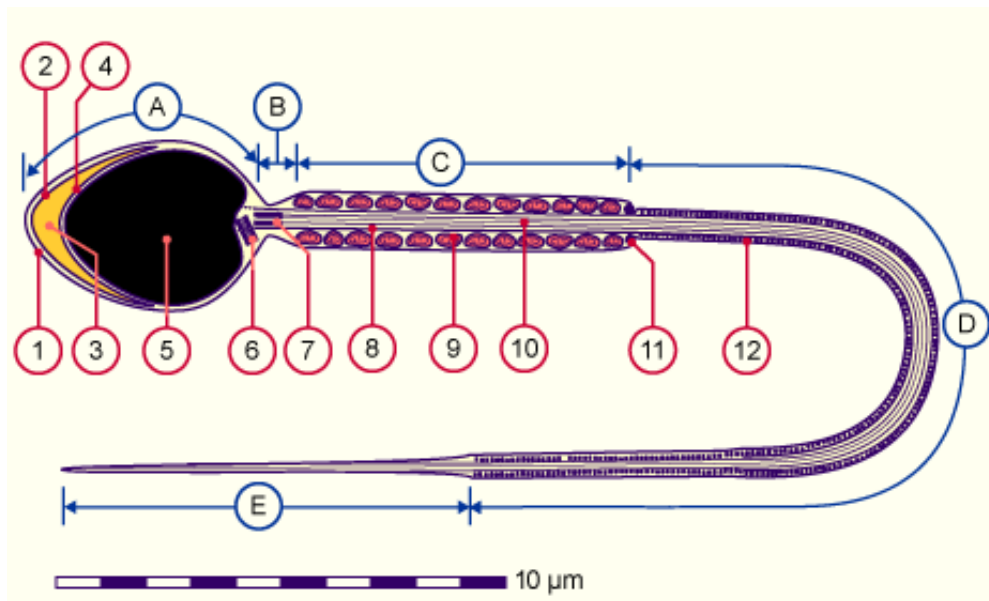
Správná morfologie spermií má důležitý vliv na kvalitu oplození. Normální lidská spermie má hladký a oválný tvar hlavičky, s dobře definovaným akrozomem, který pokrývá 40 – 70 % apikální části hlavy spermie. Základna hlavičky by měla být široká pouze s jedním, symetricky připevněným bičíkem. Bezprostředně za hlavou by měla první část bičíku být o něco silnější (ale stále štíhlá) ve srovnání se zbytkem bičíku.

3.3.1 Stavba spermie

Hlavička spermie má oválný, eliptický a zploštěný tvar tak, že při pohledu z profilu je hruškovitého tvaru. Její první dvě třetiny jsou pokryty vrstvou modifikované protoplazmy. Hlavní součástí hlavičky je jádro (obsahuje DNA) a akrozom, který obsahuje proteázu, hyaluronidázu a fosfatázu. Ty pomáhají penetraci spermie do oocytu.

Krček je méně zúžen. Přední centrioly se nacházejí na rozhraní krčku a hlavičky. Za krčkem je lokalizován spojovací kus (tělo). Je tyčinkovitého tvaru a na křížovatce těla a krčku jsou zadní centrioly. Tělo je tvořeno axiálním svazkem mikrotubulů, které jsou obklopeny šroubovitě uspořádanými mitochondriemi.

Bičík je nejdelší částí spermie a poskytuje jí motilitu na základě unikátního uspořádání mikrotubulů. Bičík se skládá z axiálního vlákna obklopeného membránou. [7, 8, 9] Morfologická stavba spermie je zobrazena na Obrázku 3.



Obrázek 3: Morfologický popis spermie. *Převzato z: [40]*

(**A** Hlavička, **B** Krček, **C** Střední oddíl, **D** Hlavní část bičíku, **E** Koncová část bičíku, **1** Plasmatická membrána, **2** Vnější akrozomální membrána, **3** Akrozom, **4** Vnitřní akrozomální membrána, **5** Jádro, **6** Proximální centrioly, **7** Distální centrioly, **8** Vnější fibrózní vlákna, **9** Mitochondrie, **10** Axonema, **11** Anulus (terminální disk), **12** Prstencová vlákna)

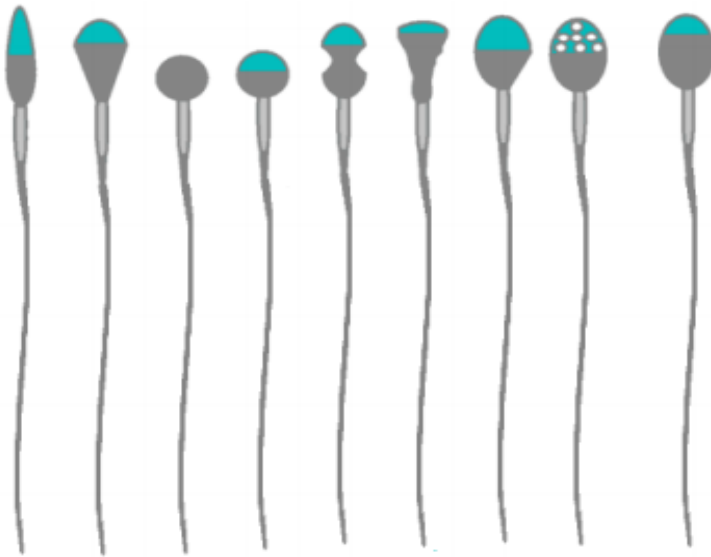
3.4 Odchylky v morfologii spermii

Morfologie je jedním z parametrů spermiogramu. Podle hodnot WHO, 5. edice postačují pouze 4 % spermii s normální morfologií k výsledku normozoospermie. [23]

3.4.1 Odchylky v morfologii hlavičky

Vady hlavičky (viz. Obrázek 4) lze rozdělit podle řady abnormalit, mezi vady hlavičky patří nejčastěji:

- makrocefalie (abnormálně velká)
- mikrocefalie („špendlíková“ hlavička)
- hlavička hruškovitého tvaru
- hlavička kulatá, amorfní
- vakuolizace (> 20 % plochy hlavičky je obsazeno vakuolami)
- hlavička s malým akrozomem (< 40 % plochy hlavičky)
- dvě a více hlaviček [10]

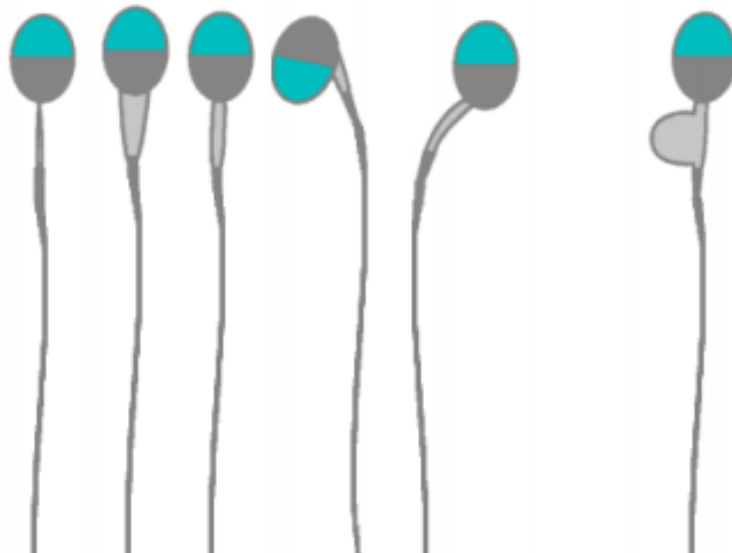


Obrázek 4: Odchyly v morfologii hlavičky (z leva: zahrocená hlavička, hruškovitá hl., špendlíková hl. bez akrozomu, špendlíková hl. s akrozomem, 3 × amorfní hl., vakuolizovaná hlavička, hlavička s malým akrozomem).

Převzato z: [41]

3.4.2 Odchyly v morfologii krčku a střední části

Tyto abnormality (viz. Obrázek 5) jsou obvykle spojeny se strukturálními defekty mitochondrií, centriol a mikrotubulů. Také mohou být spojeny s uchováním velkých cytoplasmatických kapek. [10]



Obrázek 5: Odchyly v krčku a střední části (z leva: tenký krček, silný krček, fyziologický krček, ohnutý krček, asymetrická inserce, velká cytoplasmatická kapka).

Převzato z: [41]

3.4.3 Odchyly v morfologii bičíku

Typické vady bičíku (viz. Obrázek 6) jsou spojeny s těmito abnormalitami: krátký bičík, mnohočetný bičík, zlomený bičík, ohnutý bičík a bičík s nepravidelnou šířkou. [10]



Obrázek 6: Odchyly v morfologii bičíku (zleva: krátký bičík, zalomený bičík, ohnutý bičík). *Převzato z:* [41]

3.5 Nejčastější příčiny ovlivňující kvalitu spermiogramu

Mužský faktor je jedinou příčinou neplodnosti u 30 % neplodných párů a z 20 – 45 % je přispívajícím faktorem u párů s reprodukčními problémy. [11]

3.5.1 Věk

S rostoucím věkem muže je nejčastěji zaznamenán pokles objemu ejakulátu, koncentrace spermií, motility spermií a morfologie spermií. Zároveň s rostoucím věkem dochází ke zvýšení DNA fragmentace ve spermiích. Věk muže má tedy významný vliv na fertilizaci. [12]

3.5.2 Genetické příčiny

Genetické příčiny tvoří asi 10 – 15 % závažné mužské neplodnosti včetně chromosomálních aberací a jednobodových mutací. [3]

Prevalence chromosomálních anomálií u neplodných mužů není přímo úměrná koncentraci spermií. Nejběžnější chromosomální anomálií neplodných mužů je Klinefelterův syndrom (XXY), představující asi dvě třetiny chromosomálních abnormalit neplodných mužů. [13, 14]

3.5.3 Vliv prostředí

Různé faktory prostředí mohou vést k mužské neplodnosti. Mezi tyto faktory se řadí infekce pohlavního ústrojí, nadměrné teplo, vystavení radiaci, jedovatost těžkých kovů, kouření cigaret, exogenní příjem estrogenu, účinek pesticidů a dalších chemikálií.

Kouření cigaret (> 10 cigaret denně) ovlivňuje pohyblivost, koncentraci a morfologii spermií. Bylo prokázáno, že u kuřáků existuje významný pokles zinku v seminální plasmě s výsledným poklesem antioxidační obrany. Takto by mohl být vysvětlen účinek kouření na kvalitu SPG. Obsah protaminu je nezbytný pro správnou kondenzaci chromatinu ve spermiích a následně mužskou plodnost. Protaminy jsou hlavními jadernými proteiny spermií. Oxidativní stres vyvolaný kouřením cigaret ovlivňuje obsah protaminu. [15, 16]

Zvýšení teploty šourku je jedním z hlavních faktorů, který omezuje tvorbu spermií a steroidů ve varlatech. [17]

Infekce mužských přídatných pohlavních žláz jsou považovány za potencionální nebezpečí pro mužskou plodnost. Infekce jsou obvykle spojeny s přítomností leukocytů v ejakulátu a vysokou koncentrací volných kyslíkových radikálů (ROS), jelikož leukocyty představují hlavní zdroj tvorby ROS. Ačkoli jsou leukocyty fyziologickou součástí ejakulátu (< 1 x 10⁶/ ml) a prakticky je obsahuje každý vzorek. Pokud prevalence leukocytů přesáhne normální hodnoty, spermie jsou ohroženy. [18, 19]

4 ZÁKLADNÍ TECHNIKY ASISTOVANÉ REPRODUKCE

4.1 Hormonální stimulace ovárií

Programované superovulační protokoly poskytují pohodlný a efektivní prostředek pro naplánování a organizaci cyklu IVF.

Protokol, který se používá pro stimulaci za účelem maximálního zisku oocytů, spočívá v regulaci GnRH. Zároveň jsou podávány preparáty obsahující folikuly stimulující hormon a luteinizační hormon. Existuje mnoho variant stimulačního protokolu. S agonistou GnRH se může začít stimulovat v luteální nebo folikulární fázi předchozího menstruačního cyklu. Posledním krokem hormonální stimulace před odběrem oocytů (OPU), je podkožní aplikace hCG (lidský choriový gonadotropin). Aplikace hormonu zajistí dozrání vajíček. [2, 3]

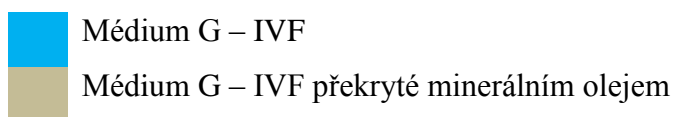
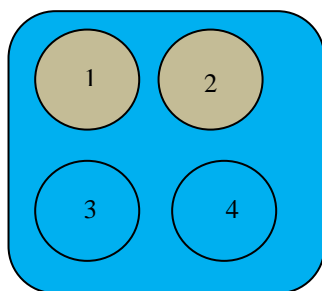
4.2 Odběr oocytů (ovum pick – up, OPU)

Před odběrem oocytů proběhne v OPU laboratoři příprava kultivačních misek pro uchování odebraných oocytů, médií určených k proplachu folikulů a dalších misek pro manipulaci s oocyty a embryi, které jsou uloženy v CO₂ inkubátoru.

OPU se provádí v celkové anestézii pacientky. Pod ultrazvukovou kontrolou lékař odsaje 1 – 2 folikuly do sterilní zkumavky a zkumavka se předá do laboratoře. Folikulární tekutina se prohlíží pod stereomikroskopem v laminárním boxu s vyhřevnou plotnou. Každý objekt ve folikulární tekutině se prohlédne a nalezený oocyt (viz. Obrázek 9) hlásí lékaři na zákrovový sál. Pokud oocyt není přítomen, hlásí embryolog proplach folikulu. Veškerá odsátá tekutina se prohlíží pod stereomikroskopem v laboratoři. Nalezený oocyt se přenesse do středu kultivační misky, kde se propláchne v médiu. Následně se přenesse do jamky číslo 1 kultivační misky (viz. Obrázek 7). Zbylá folikulární tekutina se vylije do kádinky. Oocyt a jeho kvalita se zaznamenají do kultivačního protokolu pacientky. Kultivační miska s oocyty se umístí zpět do CO₂ inkubátoru. Postup se opakuje až do doby, kdy se prohlédne všechna aspirovaná folikulární tekutina.

Po dokončení hledání oocytů jsou všechny oocyty přeneseny do jamky číslo 2 kultivační misky.

Kvalita oocytů se hodnotí v počtech křížků. Křížky vyjadřují především kvalitu a počet buněk cumulus oophorus.



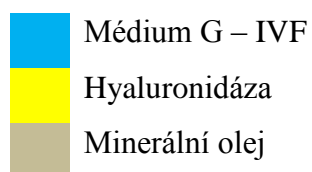
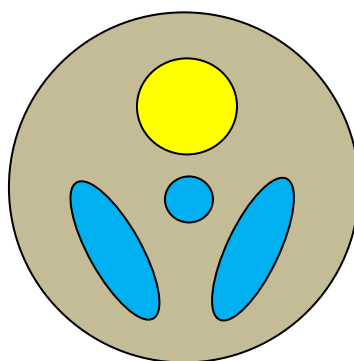
Obrázek 7: Miska pro odběr oocytů. *Zdroj: autor*

4.3 Denudace oocytů

Denudací se rozumí odstranění buněk cumulus oophorus a corona radiata z oocytů. Takto „očistěné“ oocyty jsou připraveny k oplození mikromanipulační technikou (viz. Obrázek 10). [20, 21, 22]

Oocyty jsou přeneseny do média s hyaluronidázou. Jakmile se začnou kumulární buňky působením hyaluronidázy rozkládat, přenesou se oocyty do média G – IVF (viz. Obrázek 8). Zde jsou oocyty denudovány opakovaným nasáváním do šedé denudační pipety. V další fázi jsou oocyty zbaveny zbytku buněk corona radiata nasáváním a vysáváním v bílé denudační pipetě. Vzhledem k metodice se pracuje vždy se skupinou pěti oocytů.

Očištěné oocyty se hodnotí podle kvality, zralosti a přítomnosti polárního tělíska (viz. Tabulka 1). Oocyty připravené k mikromanipulaci jsou umístěny do kultivační misky a cca za 4-6 hodin po OPU mohou být použity pro účely IVF, ICSI.



Obrázek 8: Miska pro denudaci oocytů. *Zdroj: autor*

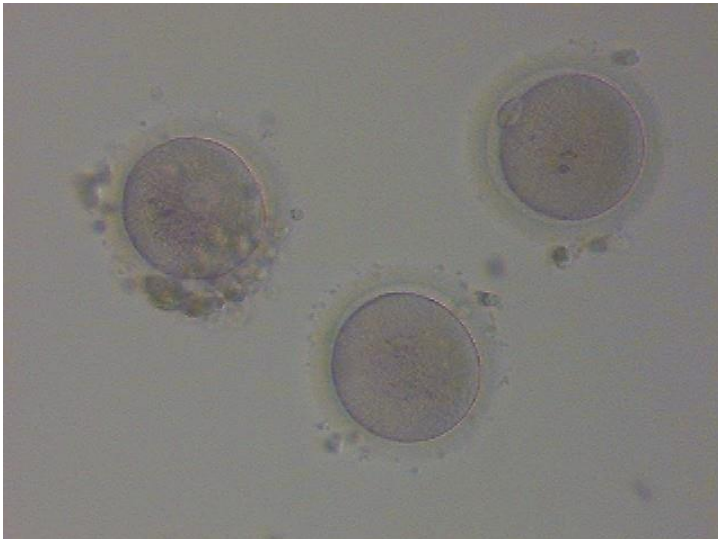
Tabulka 1: Hodnocení oocytů po denudaci

GV	Germinal vesicul, v cytoplasmě je přítomno membránou ohraničené jádro, v perivitelním prostoru (PP) není patrna žádná pólová buňka, jedná se o nezralý oocyt, pro oplození se nepoužívá.
MI	V cytoplasmě oocytu není patrna žádná struktura jádra, v PP není přítomna pólová buňka, jedná se o nezralý oocyt, který se pro oplození nepoužívá.
M II	V cytoplasmě oocytu není patrna žádná struktura jádra, v PP je přítomna jedna pólová buňka, jedná se o zralý oocyt použitelný pro oplození.
DEG	Struktura oocytu je zhroucená, barva cytoplasmy je tmavě hnědá.
PZP	Prázdná zona pellucida (ZP), v ZP se nenachází oocyt.

Zdroj: autor



Obrázek 9: Oocyt po OPU. *Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech*



Obrázek 10: Oocyty po denudaci (zleva: GV, MI, MII). *Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech*

4.4 Analýza a zpracování ejakulátu

Zpracování ejakulátu patří mezi základní techniky asistované reprodukce. Během zpracování ejakulátu je stanoven počet spermií, jejich pohyblivost a kvalita – spermigram.

4.4.1 Provedení spermiogramu

Po předání vzorku pacientem do laboratoře se ejakulát nechá 10 – 20 minut zkapalnět při laboratorní teplotě. Je – li vzorek stále viskózní, ejakulát se rozvolní opakovaným nasáváním a vysáváním v injekční stříkačce.

Po zkapalnění následuje:

- Makroskopické zhodnocení ejakulátu, zjištění objemu a viskozity
- Mikroskopické vyšetření

Spermiogram se stanovuje z ejakulátu odevzdaného *per onaniam* v odběrové místnosti IVF centra. Zkapalněný ejakulát se nasaje do injekční stříkačky a odměří se celkový objem ejakulátu. Dále se stanovují a hodnotí vybrané parametry dle WHO (viz. Tabulka 2, 3) [23]. Hodnotí morfologie spermií, výskyt aglutinací a přítomnost kulatých buněk či jiných příměsí. Získané hodnoty se zaznamenají do protokolu a porovnají s danými hodnotami WHO, 5. edice.

Tabulka 2: Normální hodnoty spermiogramu dle standardů WHO, 5. edice

Parametr	Fyziologické hodnoty SPG
Barva	šedá, opaleskující
Objem	> 1,5 ml
pH	7,2 – 7,8
Agglutinace (0 - 4)	0 – 1
Koncentrace spermií	$\geq 15 \times 10^6/ \text{ml}$
Celková motilita	$\geq 40 \%$
PR motilita	$\geq 32 \%$
Morfologie	$\geq 4 \%$ normálních forem
Leukocyty	$< 1 \times 10^6/ \text{ml}$

Převzato z: [23]

Tabulka 3: Hodnocené parametry spermiogramu dle WHO

Parametr	Jednotky
Objem	ml
Koncentrace spermií	mil/ml
Celková motilita	%
PR motilita	%
Morfologie	%
Aglutinace	+
Leukocyty	mil/ml

Převzato z: [23]

4.4.1.1 Stanovení koncentrace spermií

Ke stanovení je nutný neředěný vzorek. Maklerova komůrka se skládá ze dvou částí. Krycí část je ve středu opatřena jemnou mřížkou sestavenou ze sta čtverců o velikosti 0,1 x 0,1 mm. Celá mřížka je rozdělena na čtvrtiny středovým křížem. [23, 24]

Pro stanovení koncentrace se spočítají hlavičky spermií v deseti čtvercích ve vodorovné nebo svislé řadě. Výsledná hodnota vyjadřuje koncentraci spermií v milionech na mililitr.

4.4.1.2 Hodnocení pohybu spermií

Nejprve se spočítá pohyb všech spermií v deseti čtvercích a poté množství progresivních, neprogresivních a imotilních spermií. Kritéria pro hodnocení jsou uvedeny o tabulce 4.

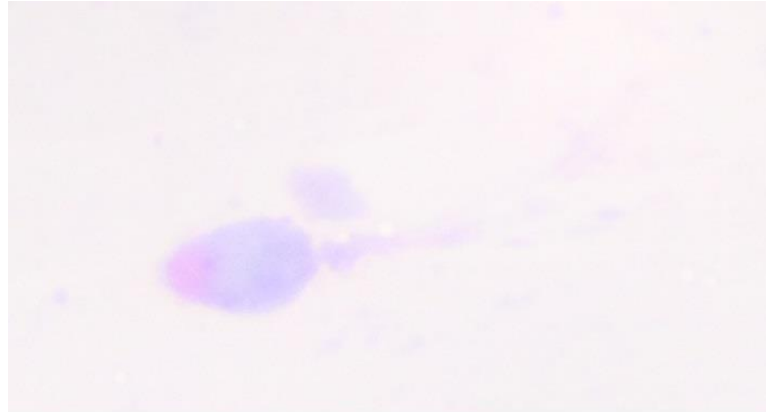
Tabulka 4: Kritéria pohybu spermií

Pohyb progresivní	PR	Aktivně pohybující se spermie bez ohledu na rychlost.
Pohyb neprogresivní	NP	Bičík spermie se pohybuje, ale prostorový pohyb spermie je téměř nulový.
Spermie imotilní	IM	Nejsou patrné ani pohyby bičíku.

Zdroj: autor

4.4.1.3 Hodnocení morfologie spermií

Morfologicky normální spermie má hladce oválný tvar hlavičky s jasně definovaným akrozomem (viz. Obrázek 11). Akrozom zabírá 30 – 70 % hlavičky a obsahuje maximálně tři malé vakuoly. Jediný bičík nasedá symetricky na bázi hlavičky.



Obrázek 11: Obarvená spermie s normální morfologií. *Autor: vlastní*

4.5 Zpracování ejakulátu

Techniky zpracování ejakulátu slouží pro přípravu suspenze spermií v rámci cyklu IVF, ICSI (interacytoplasmatická injekce spermie)/IMSI (interacytoplasmatická injekce morfologicky selektované spermie)/PICSI (preselektovaná intracytoplasmatická injekce spermie) nebo IUI (intrauterinní inseminace) a také pro kryokonzervaci ejakulátu. Cílem zpracování ejakulátu je zakoncentrování, přečištění a odstranění imotilních spermií. [25, 26] Konečné hodnocení je uvedeno v tabulce 5.

Pro zpracování ejakulátu je do centrifugační kónické zkumavky navrstven hustotní gradient (1,5 ml 90% roztok SpermGradu (SG) + 0,3 ml 70% SG + 0,3 ml 50% SG). Takto připravený gradient je umístěn v inkubátoru při 37°C.

Pomocí injekční stříkačky s jehlou se celý objem ejakulátu opatrně navrství na hustotní gradient. Zkumavka s gradientem se uzavře a označí štítkem obou partnerů. Vzorek se centrifuguje 20 minut při 2000 otáčkách.

Sterilní plastovou Pasteurovou pipetou se odsaje supernatant a peleta je resuspendována v 8 mililitrech poplachového média.

Zkumavka s obsahem se uzavře a znovu centrifuguje 8 minut při 2000 otáčkách.

Po ukončení centrifugace se supernatant slije a vzniklá peleta zůstane převrstvena cca 1 mililitrem média (množství média se volí podle kvality SPG)¹.

¹ Pokud je ve SPG nízká koncentrace spermií nebo malé množství PR motilních spermií ponechá se média menší množství a naopak. Vyhodnocení závisí na embryologovi, který metodu provádí.

Tabulka 5: Definice nejčastěji používaných pojmů k vyjádření konečného výsledku spermioqramu

Azspermie	Označuje nepřítomnost ejakulátu.
Hypospermie	Označuje nízký objem ejakulátu (< 1,5 ml).
Azoospermie	Označuje nepřítomnost spermií v ejakulátu.
Normozoospermie	Označuje vzorek, který splňuje všechny fyziologické parametry (viz. Tabulka 2).
Oligozoospermie	Označuje snížený počet spermií v ejakulátu (<15 x 10 ⁶ / ml).
Astenoospermie	Vyjadřuje stav, kdy procento progresivně se pohybujících spermií je < 32 %.
Teratoospermie	Označuje stav, kdy je v ejakulátu přítomno vysoké množství patologických forem spermií (> 96 %).
Kryptoospermie	Označuje stav, kdy v nativním vzorku nejsou nalezeny spermie, ale v peletě po centrifugaci jsou nalezeny.
Nekroospermie	Je stav, kdy jsou v ejakulátu nalezeny mrtvé a nepohyblivé spermie.

Převzato z: [23]

4.6 Metody oplození *in vitro*

Získané oocyty jsou týž den oplozovány. Ve většině případů je pro zajištění fertilizace využita metoda ICSI nebo IMSI. V některých případech jsou oocyty oplozovány spontánně, IVF. Indikace použité metody je v rukou lékaře.

4.6.1 Fertilizace *in vitro*

Tato technika je známá od roku 1978 a je první technikou, která byla použita k léčbě neplodnosti. S postupem času a vývoje nových metod je tato technika postupně nahrazována jinými. Důležité je také zmínit, že „klasická IVF“ je nahrazována pro velké množství svých nevýhod. [27]

Po dokončení vyhledávání oocytů se oocyty rozdělí pomocí automatické pipety do jamek číslo 1, 2, 3 a 4 v kultivační misce. Oocyty se rozdělí tak, aby jich v každé jamce byl přibližně stejný počet.

Takto připravená miska s oocyty se vloží do CO₂ inkubátoru. Minimálně po 4 - 6 hodinách po OPU se provede inseminace oocytů.

Pomocí automatické pipety se do každé jamky s oocyty přidá suspenze spermií (viz. Zpracování ejakulátu). Kultivační miska se vloží zpět do CO₂ inkubátoru. Zhruba za 18 hodin se pod mikroskopem zhodnotí fertilizace oocytů.

4.7 Kultivace a hodnocení embryí

Kultivace embryí patří mezi jednu z nejdůležitějších činností asistované reprodukce a navazuje na odběr oocytů. Minimální doba kultivace nutná pro provedení léčebné terapie je 48 hodin, maximální pak 120 - 144 hodin. To je pátý nebo šestý den od oplození oocytu, kdy embrya dosahují stádia blastocysty. V tomto případě mluvíme o prodloužené kultivaci. Hodnocení vývojových stádií embryí nás informuje o jejich kvalitě a vývoji. Stupeň kvality embryí tzv. grade je kombinace číslic a písmen a zapisuje se každý den do kultivačního protokolu. Kultivace je ukončena následným embryotransferem nebo kryokonzervací.

4.7.1 Hodnocení jednotlivých stádií embryí

Den 1

Hodnotí se úspěšnost fertilizace na základě přítomnosti dvou prvojader (2PN) a dvou polárních tělísek v perivitelním prostoru (viz. Obrázek 12). Zároveň se hodnotí neoplozené, degenerované a špatně oplozené oocyty (viz. Tabulka 6), které je potřeba odstranit před další kultivací.

Tabulka 6: Hodnocení fertilizace

Stádium	Intepretace
2PN	Normálně oplozený oocyt. V cytoplasmě jsou přítomna 2PN a v PP jsou vydělena 2 PB.
1PN	Abnormálně oplozený oocyt. V cytoplasmě je přítomno pouze jedno PN a v PP je poze jedno PB.
3PN/4PN – nPN	Triploidně/tetraploidně, polyploidně opozený oocyt. Přítomnost 3/4PN – nPN v cytoplasmě.
NF	Neoplozený oocyt. Je viditelné pouze 1 PB a žádné PN.
DEG	Degenerovaný oocyt.

Zdroj: autor



Obrázek 12: Správně oplozené oocyty (2PN). *Zdroj: autor*

Den 2 a Den 3 (Hodnocení časných stádií embryí)

Po dvou dnech vývoje by mělo embryo ideálně obsahovat 4 blastomery (viz. Obrázek 13) a po osmi dnech 8 blastomer. Hodnocení probíhá kombinací číslic a písmene (viz. Tabulka 7).

Tabulka 7: Význam symbolů v hodnocení kvality embryí den 2 a den 3

Symbol	Intepretace symbolu
První číslice	Počet blastomer
Písmeno	A = stejná velikost blastomer
	B = rozdílná velikost blastomer
Druhá číslice (určuje stupeň fragmentace)	1 = embryo bez fragmentace
	2 = < 20 % fragmentace
	3 = 20 – 50 %
	4 = > 50 % fragmentace

Zdroj: autor



Obrázek 13: Embrya den 2. *Zdroj: autor*

Den 4

Hodnotí se zejména kompaktace a kavítace. Kompaktace může být částečná – několik blastomer zůstává stejných. Kompaktované embryo se vyznačuje zříváním všech blastomer, které nemají viditelná jednotlivá ohraničení (viz. Obrázek 14). Čtvrtý den je možné pozorovat stádium časně blastocysty (FBC), kde je již patrný blastocel.



Obrázek 14: Kompaktovaná morula. *Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech*

Den 5 a Den 6 (Hodnocení kvality blastocyst)

Hodnotí se kvalita trofoektodermu (trofoblastu) a vnitřní buněčné masy (ICM). Jedná se opět o kombinaci číslice a písmen. Význam jednotlivých symbolů vysvětluje následující tabulka 8. Jednotlivé typy blastocyst jsou zobrazeny na obrázcích 15-17.

Tabulka 8: Hodnocení embryí ve stádiu blastocysty

Symbol	Interpretace symbolu
<p>Číslice</p> <p>Vyjadřuje velikost a expanzi blastocelu.</p>	<p>3 = kavitovaná blastocysta</p> <p>Blastocel vyplňuje téměř celý objem BC. Viz. Obrázek 15</p>
	<p>4 = expandovaná blastocysta</p> <p>Embryo je celkově větší než v předchozím případě. ZP je velmi tenká. Je dobře viditelný embryoblast. Viz. Obrázek 16</p>
	<p>5 = hatchující blastocysta</p> <p>Je patrné „špulení“ buněk trofoblastu skrz ZP. Viz. Obrázky 16, 17</p>
	<p>6 = hatchovaná blastocysta</p> <p>Blastocysta je mimo ZP. Viz. Obrázek 17</p>
<p>První písmeno</p> <p>Udává kvalitu embryoblastu.</p>	<p>A – Embryoblast tvoří mnoho buněk, které jsou velmi těsně spojené.</p>
	<p>B – EB je tvořen menším množstvím buněk.</p>
	<p>C – EB tvoří několik málo rozvolněných a špatně viditelných buněk.</p>
<p>Druhé písmeno</p> <p>Udává kvalitu trofoblastu.</p>	<p>A – Trofoblast je tvořen velkým množstvím buněk, které jsou pravidelné a tvoří soudržný celek.</p>
	<p>B – TB je složen z menšího množství pravidelných buněk. Ty jsou částečně rozvolněny.</p>
	<p>C – TB je nepravidelný, tvořený malým množstvím buněk.</p>

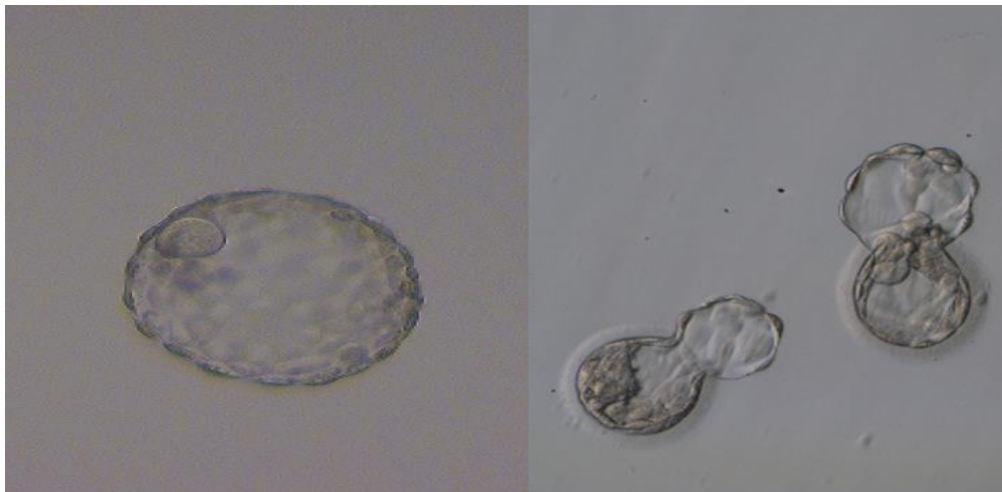
Zdroj: autor



Obrázek 15 Blastocysta 3AA. Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech



Obrázek 16 Blastocysty (z leva: 5AA, 4AB). Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech



Obrázek 17: Blastocysty (6AA, 5AA, 5AA). Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech

4.8 Asistovaný hatching

Asistovaný hatching (AH) je mikromanipulační technika, během které je otevřena zona pellucida (ZP). Tím je usnadněn proces hatchingu (uvolnění embrya z nebuněčné ZP), ke kterému dochází po expanzi blastocysty. Indikací k AH může být věk pacientky, opakované IVF cykly bez předchozí implantace či abnormálně silná zona pellucida, plánované PGD. Metoda se provádí čtvrtý den kultivace.

Existují 2 typy AH:

- Mechanický AH – fixace embrya v Holding pipetě a mechanické otevření ZP hatchovací jehlou
- Laserový AH – otevření ZP působením laserového paprsku

4.8.1 Laserový AH

Pro svoji časovou nenáročnost a relativní bezpečnost je častěji využíván tento typ AH.

Kultivační miska s embryi k AH se položí na vyhřívaný pracovní stůlek mikroskopu. Při malém zvětšení (40x) se embrya nastaví tak, že jsou viditelná ve středu počítačové obrazovky. Následně se vymění klasický objektiv za laserový. Posunem stolku se nastaví vodící kříž na místo, kde má být vypálen otvor do ZP. Je voleno takové místo na embryu, kde je prostor mezi ZP a blastomerami a zároveň se zde ZP jeví nejtenčí (viz. Obrázek 18, 19).

Stlačením pedálu, který ovládá laser, se vypálí otvor do ZP. A tímto postupem se provede AH u všech embryí v kultivační misce.

Je-li embryo ve stádiu časně blastocysty, neprovádí se úplný AH, ale pouze ztenčení ZP. Nesmí dojít k porušení vnitřních buněčných komponent.



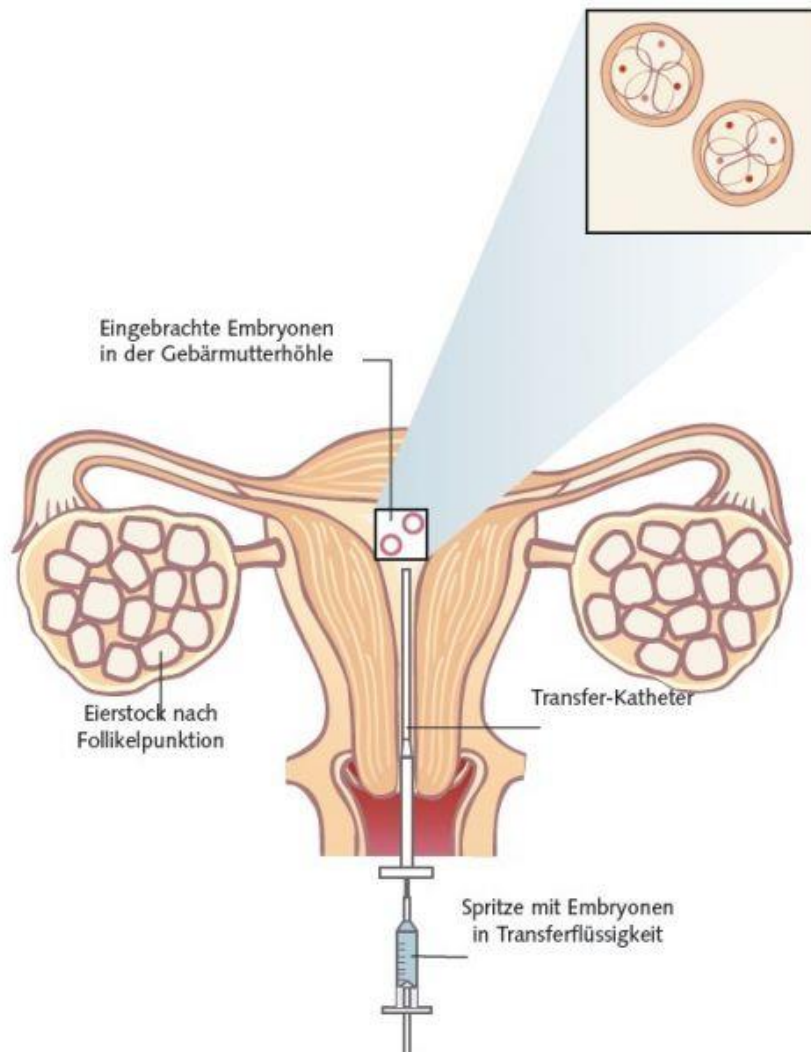
Obrázek 18: Embryo před AH. Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech



Obrázek 19: Embryo po AH. Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech

4.9 Transfer embryí – embryotransfer

Embryotransferem (ET) se rozumí ambulantní výkon, kdy lékař s embryologem šetrně zavádí embryo v katetru přes děložní hrdlo do sliznice dutiny děložní (viz. Obrázek 20). Tímto výkonem je zakončen proces mimotělního oplodnění a navazuje bezprostředně na kultivaci embryí. ET se provádí ve většině případů 5-tý den kultivace embryí. Transferuje se obvykle jedno embryo, s ohledem na anamnézu a přání pacientky je možné počet transferovaných embryí upravit (1 – 2). Transfer může probíhat i u kryokonzervovaných embryí po jejich rozmražení – kryoembryotransfer.



Obrázek 20: Embryotransfer. *Převzato z:* [42]

5 PRAKTICKÁ ČÁST

5.1 Materiál a metodiky

Mezi použitý biologický materiál v této práci patří především spermie, oocyty a embrya použité v rámci partnerského a mimopartnerského darování. V této části jsou uvedeny metodiky aktivního oplození oocytů, díky kterým jsme získali data do naší práce.

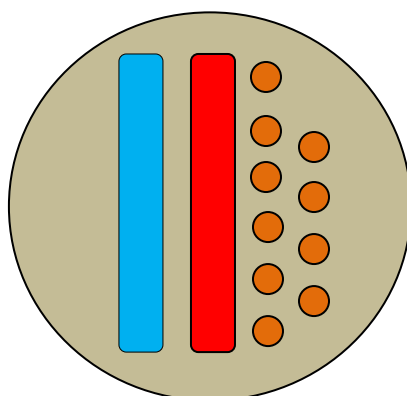
5.2 Intracytoplasmatická injekce spermie

Od zveřejnění prvních dokumentů o použití ICSI pro oligozoospermiky v roce 1992 a 1993, intenzivní vědecké úsilí rozšířilo uplatnění ICSI prakticky na každý typ mužské neplodnosti. Během techniky ICSI je injikována jedna konkrétní spermie do oocytu za účelem oplození. [28, 29]

Pomůcky:

- a) technické** – kultivační miska 4 – Well dish, sterilní špičky, automatická pipeta, ICSI misky, Holding pipeta, ICSI pipeta
- b) chemické** – kultivační médium G – 1 (Vitrolife), G – IVF médium (Vitrolife), ICSI médium (Vitrolife), G – MOPS médium (Vitrolife), temperovaný minerální olej (Sage)
- c) přístroje** – laminární box LaminAir Sterile 1, 8 GL (Holten), CO₂ inkubátor HeraCell 240 (Kendro), Gasboy Labotect C42 (Ybux), stereomikroskop MZ 16 (Leica), mikroskop DMIL Leica (Leica), ICSI mikroskop Olympus IX 70 (Olympus), mikromanipulátory TMK a injektory Cell Tram Oil (Eppendorf), vyhřívací stolek MATS – SZX (Tokai Hit),

Biologický materiál: suspenze spermií připravená v andrologické laboratoři, denudované oocyty



Obrázek 21: Mikromanipulační miska pro ICSI/IMSI. *Autor: vlastní*

Pomocí automatické pipety se do proužku média G – IVF (viz. Obrázek 21) přidá suspenze partnerových spermií (viz. Zpracování ejakulátu). Automatickou pipetou se sterilní špičkou se do jednotlivých kapek média G – MOPS umístí denudované oocyty. Mikromanipulační miska se přenese na vyhřívaný stolek ICSI mikroskopu.

Při objektivu 20x se injektorem nasaje do ICSI pipety více spermií. Spermie se přenesou do proužku s ICSI médiem a tady se vypustí a znehybní pomocí ICSI pipety. Špičkou pipety se bičík spermie přitlačí lehce ke dnu misky. Krátkým pohybem pipety zprava doleva a zpět je spermie zcela znehybněna. Vybraná a znehybněná spermie se nasaje do ICSI pipety od konce bičíku. To znamená, že k ústí pipety směřuje hlavička spermie.

Oocyt se nastaví do zorného pole a jemným tlakem se zafixuje do Holding pipety. ICSI pipetou se oocyt pootočí tak, že pólové tělíčko je v poloze 11 nebo 7 hodin.

Hrot ICSI pipety se opře o ZP a spermie se posune do ústí pipety. Takto je odstraněno přebytečné množství ICSI média. Jemným tlakem se zavede ICSI pipeta pod zonu pelucidu i oolemu. Jemně a kontrolovaně se aspiruje cytoplasma, dokud nedojde k viditelnému prasknutí oolemu. Cytoplasma spolu se spermií je injikována do oocytu (viz. Obrázek 22). Pomalým tahem se vytáhne ICSI pipeta z oocytu. Takto injikovaný oocyt se uvolní z Holding pipety. Tímto postupem se injikují všechny oocyty dané pacientky.

Všechny injikované oocyty se umístí do jamky číslo 3 a 4 v kultivační misce. Kultivační miska se vloží do inkubátoru. Za 16 – 18 hodin se hodnotí fertilizace.



Obrázek 22: ICSI/IMSI. Zdroj: Pavla Nováková, IVF Zentren Prof. Zech

5.3 Intracytoplasmatická injekce morfologicky selektované spermie

Tato technika byla zavedena v roce 2001 a představuje sofistikovanější způsob ICSI, kdy je do oocyty injikována spermie po morfologické selekci. Této selekce se dosáhne pomocí IMSI objektivu. [30, 31]

Pomůcky:

- a) technické** – kultivační miska 4 – Well dish, sterilní špičky, automatická pipeta, ICSI misky, Holding pipeta, ICSI pipeta
- b) chemické** – kultivační médium G – 1 (Vitrolife), G – IVF médium (Vitrolife), ICSI médium (Vitrolife), G – MOPS médium (Vitrolife), temperovaný minerální olej (Sage)
- c) přístroje** – laminární box LaminAir Sterile 1, 8 GL (Holten), CO₂ inkubátor HeraCell 240 (Kendro), Gasboy Labotect C42 (Ybux), stereomikroskop MZ 16 (Leica), mikroskop DMIL Leica (Leica), ICSI mikroskop Olympus IX 70 (Olympus), mikromanipulátory TMK a injektory Cell Tram Oil (Eppendorf), vyhřívací stolek MATS – SZX (Tokai Hit), IMSI objektiv (Olympus)

Biologický materiál: suspenze spermií připravená v andrologické laboratoři, denudované oocyty

Tato metoda je téměř shodná s ICSI. Odlišuje se až morfologickou selekcí spermií v proužku média ICSI.

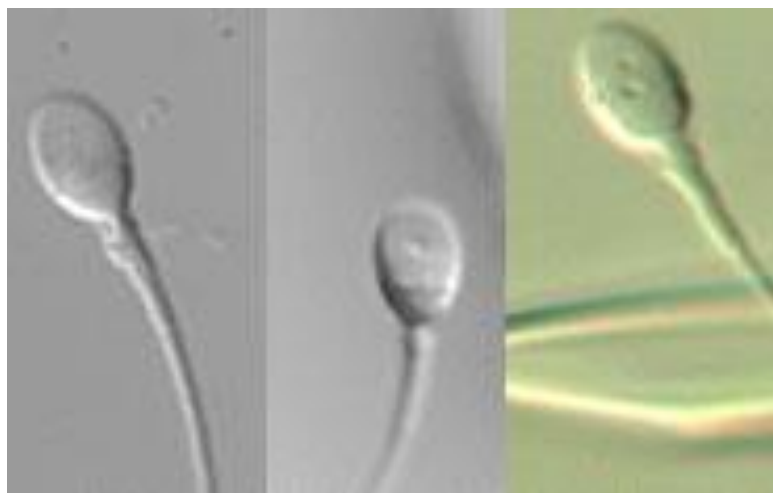
Po immobilizaci spermie ICSI pipetou je k morfologické selekci použit IMSI objektiv. Díky hodnocení tímto objektivem jsou spermie rozděleny do 3 tříd (viz. Tabulka 9). Touto selekcí je do oocytu injikována morfologicky nejlepší spermie. [32]

Vlastní injekce a dokončení techniky je shodné s metodou ICSI.

Tabulka 9: Morfologická selekce spermií podle jednotlivých tříd

1. třída	Normální morfologie a velikost: ovalná, hladká, symetrická Normální chromatin: žádné nebo malé množství vakuol ($\leq 4\%$ povrchu jádra). Viz. Obrázek 23
2. třída	Normální morfologie a velikost Abnormální chromatin: velké vakuoly ($> 4\%$ povrchu jádra). Viz. Obrázek 24
3. třída	Abnormální morfologie a velikost Abnormální chromatin: velké vakuoly ($> 4\%$ povrchu jádra). Viz. Obrázek 25

Zdroj: autor



Obrázek 23: Spermie 1. třídy. Zdroj: IMSI Befund IVF Zentren Prof. Zech



Obrázek 24: Spermie 2. třídy. Zdroj: IMSI Befund IVF Zentren Prof. Zech



Obrázek 25: Spermie 3. třídy. Zdroj: IMSI Befund IVF Zentren Prof. Zech

5.4 Hodnocené parametry

Vliv kvality spermiogramu na fertilizaci *in vitro* a kvalitu získaných embryí jsme hodnotili v jednotlivých kategoriích pomocí FR a UR.

- 1. FR (fertilization rate) = počet 2PN / počet injikovaných oocytů**
 - podíl mezi fyziologicky oplozenými oocyty a oocyty určenými pro injekci
 - vyjadřuje procento fertilizace (kolik je oplozeno oocytů z celkového počtu oocytů určených k ICSI/IMSI)
- 2. UR (utilization rate) = celkový počet BC / počet 2PN**
 - součet všech blastocyst dělený počtem fyziologicky oplozených oocytů
 - ukazuje procentuální zisk blastocyst z oplozených oocytů

Kvalitu spermiogramu vztáženou na implantaci blastocyst jsme hodnotili pomocí parametru PR.

- 3. PR (pregnanci rate) = poz. hCG / ET**
 - počet pozitivních těhotenských testů (výsledků hCG) poděleno počtem ET
 - podává informaci, kolik žen otěhotnělo (mělo pozitivní těhotenský test) na ET

Graviditu a možný vliv kvality spermiogramu na ni jsme hodnotili pomocí IR.

- 4. IR (implantation rate) = ASP+ / ET**
 - počet zachycených srdečních akcí při UZ děleno počtem ET
 - hodnotí se počet gestačních váčků v osmém týdnu těhotenství po embryotransferu

5.5 Popis statistických metod

Statistické hodnocení jsme provedli v programu MS Excel 2007 pomocí F – testu. Výsledky jsou prezentovány jako průměrný rozdíl [%] a hladina statistické významnosti byla $p < 0,05$.

6 VÝSLEDKY

Hodnocený soubor srovnávací studie zahrnuje skupinu 100 párů, které v našem centru podstoupily terapii pomocí darovaných oocytů s následným kryoembryotransferem.

První úrovní selekce byl výběr mužů, u kterých jsme měli v den OPU k dispozici čerstvý ejakulát – „fresh sperm“.

Další úrovní selekce byl původ oocytů. Z důvodu co nejvyšší eliminace ženského faktoru, jsme zvolili právě ty páry, u kterých bylo k léčebnému cyklu užito darovaných oocytů.

Díky této selekci je možné sledovat vliv kvality spermiogramu na fertilizaci *in vitro*.

Cílem této studie je také retrospektivní srovnání mezi technikou ICSI a IMSI. Abychom mohli techniky porovnat, bylo nutné vybrat páry, u kterých bylo k terapii použito oocytů dárkyň a spermií dárců. Dárcovské spermie jsou injikovány do oocytů většinou technikou ICSI.

Jednotlivé sledované parametry jsou uvedené v tabulkách 10 – 13.

Tabulka 10: Sledované hodnoty žen

Ženy		
Průměrný věk	Průměrný počet oocytů	Prům. počet oplozovaných oocytů
22,74	19,04	14,92

Tabulka 11: Sledované hodnoty mužů

Muži	
Průměrný věk	Ø N [%]
45,15	45

N [%]: procento normozoospermiků

Tabulka 12: Sledované hodnoty dárců

Dárce	
Průměrný věk	Ø N [%]
26,17	100

N [%]: procento normozoospermiků

Podle výsledků hodnocení spermiogramu jsme vytvořili kontrolní a sledovanou skupinu mužů. Kontrolní skupinu tvořilo 45 normozoospermiků, tedy mužů, jejichž SPG splňoval všechny vyšetřované parametry podle WHO, 5. edice. Do sledované skupiny bylo zařazeno 55 mužů, jejichž SPG dosahoval ve sledovaných parametrech abnormálních hodnot (viz. Tabulka 13).

Tabulka 13: Rozdělení mužů na kontrolní a sledovanou skupinu

	Počet mužů	Zastoupení [%]
Kontrolní skupina	45	45,0
Sledovaná skupina	55	55,0

Tabulka 14: Rozdělení mužů do skupin podle výsledku SPG

Výsledek spermiogramu	Zkratka	Počet mužů	Sledovaný parametr		
			Koncentrace	Motilita	Morfologie
Normozoospermie	NSP	45	0	0	0
Oligozoospermie	OSP	9	+	0	0
Asthenozoospermie	ASP	15	0	+	0
Teratozoospermie	TSP	5	0	0	+
Asthenoteratozoospermie	ATSP	3	0	+	+
Oligoasthenoteratozoospermie	OATSP	8	+	+	+
Oligoteratozoospermie	OTSP	1	+	0	+
Oligoasthenozoospermie	OASP	14	+	+	0

0: neprokázaná abnormalita ve SPG

+: prokázaná abnormalita ve SPG

Tabulka 14 nám říká, že u 45 mužů byl spermiogram hodnocený dle parametrů WHO ve fyziologických hodnotách. Snížená koncentrace spermií v ejakulátu – oligozoospermie byla diagnostikována u 9 mužů. Nejvíce mužů (15) vykazovalo sníženou pohyblivost spermií – asthenozoospermii (ASP). Kategorie teratozoospermie (TSP), tedy muži, u kterých bylo množství morfologicky fyziologických spermií < 4 %, zahrnovala 5 mužů. U 3 mužů byla diagnostikována snížená motilita v kombinaci

s vysokým množstvím patologických forem spermií asthenoteratozoospermie (ATSP). Spermioqramy u 8 mužů vykazovaly abnormalitu v koncentraci, motilitě a morfologii oligoasthenoteratozoospermie (OATSP). Nejméně mužů (1) bylo zařazeno do kategorie oligoteratozoospermie – snížená koncentrace spermií v ejakulátu s kombinací vysokého množství patologických forem spermií. Do kategorie oligoasthenozoospermie (OASP) bylo podle vyšetření spermioqramu v andrologické laboratoři zahrnuto 14 mužů.

Tabulka 15: Přidělení darovaných oocytů k jednotlivým kategoriím podle výsledku spermioqramu

Muž		Žena		
Výsledek SPG	Ø věk	Ø věk	Ø Počet oocytů po OPU	Ø Počet oocytů po denudaci
NSP	44,76	22,58	19,20	15,09
OSP	44,22	23,33	20,78	15,78
ASP	44,20	22,53	20,47	16,20
TSP	41,40	22,60	14,8	11,40
ATSP	47,67	22,33	19,33	15,33
OATSP	48,00	23,63	17,75	14,63
OTSP	43,00	20,00	19,00	15,00
OASP	47,36	22,71	18,07	13,79

Z tabulky 15 vyplývá, že nejnižší věkový průměr dárcyň je 20,00 let a do těchto oocytů byly injikovány spermie z kategorie OTSP. Nejvyšší věkový průměr dárcyň 23,63 let byl zaznamenán u mužů s nejhorší kvalitou spermioqramu OATSP. Nejméně oocytů (11,40) pro oplození mikromanipulační technikou bylo uvolněno pro muže s teratozoospermii. Nejvíce oocytů (16,20) bylo přiděleno mužům s diagnózou asthenozoospermie. Normozoospermikům bylo přiděleno 15,90 oocytů.

Tabulka 16: Vliv jednotlivých kategorií spermogramů na fertilizaci *in vitro*

Výsledek SPG	Ø Počet oocytů k ICSI/IMSI	Ø Počet 2 PN
NSP	15,09	12,13
OSP	15,78	11,44
ASP	16,20	10,53
TSP	11,40	9,60
ATSP	15,33	9,67
OATSP	14,63	11,13
OTSP	15,00	8,00
OASP	13,79	10,60

Tabulka 16 ukazuje, že u kontrolní skupiny normozoospermiků bylo po oplození 15,09 oocytů fyziologicky oplozeno průměrně 12,13 oocytů. Nejmenší počet oplozených oocytů 9,60 byl zaznamenán u mužů v kategorii TSP. Velmi podobný počet 2 PN (9,67) byl zaznamenán i u mužů s diagnózou asthenoteratozoospermie, i když této skupině bylo přiděleno více oocytů k oplození (15,33). Nejtěžší kategorii OATSP bylo přiděleno 14,63 oocytů a oplozeno jich bylo 11,13. Nejvíce bylo přiděleno oocytů (16,20) skupině ASP – snížená motilita spermií, fyziologicky jich bylo oplozeno 10,53. Kategorie OTSP nebude již dále hodnocena, vzhledem k faktu, že tato kategorie zahrnuje pouze jeden případ. Ovšem za zmínku stojí, že v této kategorii je nejmenší počet oplozených oocytů.

Tabulka 17: Počet získaných blastocyst u jednotlivých kategorií SPG

Výsledek SPG	Ø Počet 2 PN	Ø Počet získaných blastocyst
NSP	12,13	6,71
OSP	11,44	7,56
ASP	10,53	7,00
TSP	9,60	5,20
ATSP	9,67	4,67
OATSP	11,13	6,13
OTSP	8,00	2,00
OASP	10,60	5,57

Z tabulky 17 je vidět, že u kontrolní skupiny normozoospermiků bylo získáno v průměru 6,71 blastocyst. Nejvíce blastocyst bylo získáno v kategorii OSP, kdy jsme získali v průměru 7,56 blastocyst z 11,44 oplozených oocytů. Nejméně blastocyst: 2 bylo zachyceno v kategorii OTSP. V průměru 4,67 blastocyst jsme zaznamenali u mužů, jejichž spermie vykazovaly sníženou motilitu v kombinaci se špatnou morfologií – ATSP. U mužů s výsledkem spermioqramu OATSP jsme získali po ukončení kultivace 6,13 blastocyt, což vzhledem ke kvalitě spermioqramu není nejnižší počet získaných blastocyst. Méně blastocyst (než v kategorii OATSP) bylo získáno ve skupině mužů se spermioqramem OASP, kde jsme dosáhli počtu 5,57 blastocyst z 10,60 oplozených oocytů.

Tabulka 18: Sledované parametry u kontrolní a sledované skupiny

	FR [%]	UR [%]	PR [%]	IR [%]
Kontrolní skupina	81,55	55,66	66,00	57,00
Sledovaná skupina	72,25	60,13	64,00	35,00
Rozdíl	9,30	4,47	2,00	22,00

U kontrolní skupiny normozoospermiků byl zjištěn FR 81,55 %. Ve sledované skupině (55 mužů s abnormálním SPG) byl FR 72,25 %. Mezi kontrolní skupinou normozoospermiků a sledovanou skupinou byl zjištěn u FR rozdíl 9,30% na hladině významnosti $p = 0,221$. Nejedná se o statisticky významný rozdíl.

U normozoospermiků byl vypočten UR 55,66 %. Ve sledované skupině byl UR 60,13 %. Mezi normozoospermiky a sledovanou skupinou byl v UR rozdíl 4,47 % na hladině významnosti $p = 0,434$. Jedná se tedy o statisticky nevýznamný rozdíl.

PR byl u kontrolní skupiny 66,00 % a u sledované skupiny 64,00 %. Mezi kontrolní skupinou a sledovanou skupinou byl rozdíl v PR 2,00 % na hladině významnosti $p = 0,211$. Statisticky je tento rozdíl nevýznamný.

U kontrolní skupiny byl IR 57,00 % a u sledované skupiny byl IR 35,00 %. Mezi kontrolní a sledovanou skupinou byl rozdíl v IR 22,00 % na hladině významnosti $p = 0,655$. Opět je tento rozdíl statisticky nevýznamný.

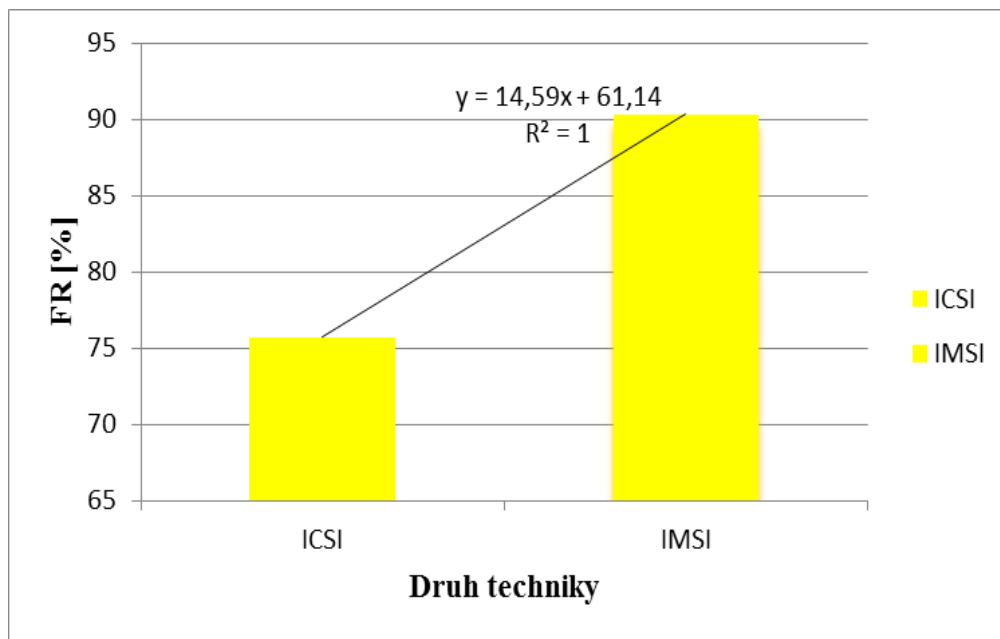
Tabulka 19: Sledované parametry u jednotlivých výsledků SPG

Kategorie SPG	FR [%]	UR [%]	PR [%]	IR [%]
OSP	71,79	66,91	89,00	50,00
ASP	64,18	70,76	63,00	57,00
TSP	84,76	52,85	0,00	0,00
ATSP	66,93	48,52	33,00	17,00
OATSP	76,26	51,61	75,00	13,00
OTSP	53,33	25,00	100,00	50,00
OASP	76,92	56,85	68,00	29,00

Tabulka 20: Srovnání techniky ICSI a IMSI na základě výsledku FR

Technika oplození	FR [%]	Počet dárců	Prům. věk	Prům. FR [%]
ICSI	70,00	9	25,44	75,73
ICSI	80,00			
ICSI	75,00			
ICSI	69,23			
ICSI	71,43			
ICSI	93,33			
ICSI	58,33			
ICSI	90,91			
ICSI	73,33			
IMSI	86,67	9	25,56	90,32
IMSI	90,00			
IMSI	90,00			
IMSI	100,00			
IMSI	88,89			
IMSI	100,00			
IMSI	84,69			
IMSI	72,73			
IMSI	100,00			

Z tabulky 20 je patrné, že FR je po technice IMSI daleko vyšší: 90,32 %. Průměrný věk dárců, jejichž spermie byly injikovány do darovaných oocytů, byl 25,44 let. Věk dárců pro techniku IMSI byl 25,56 let. Mezi hodnotami FR nebyl statisticky významný rozdíl ($p = 0,577$). Srovnání technik vyobrazuje i následující graf (viz. Graf číslo 1).



Graf 1: Porovnání techniky ICSI a IMSI

7 DISKUZE

V poslední době se velice často setkáváme s narůstajícím počtem párů, které se marně snaží o početí potomka. Mezi narůstající civilizační choroby můžeme zahrnout právě i problémy s plodností. U 35 % párů potýkajících se s problémem otěhotnět je na vině andrologický faktor, který postupně narůstá. Kvalita spermioqramu se neustále zhoršuje, jak ukazuje studie z roku 2012 [32]. Problematikou mužské plodnosti se v poslední době zabývá většina center asistované reprodukce, ať už od provedení základního vyšetření – spermioqramu, až k vysoce specifickým metodám selekce spermií.

Jedním z důvodů vzniku této práce bylo zjistit, jaký vliv má kvalita spermioqramu na *in vitro* fertilizaci. Dalším důvodem bylo porovnání mezi dvěma mikromanipulačními technikami oplození – ICSI a IMSI.

Vzorky ejakulátů byly použity pro mikromanipulační oplození darovaných oocytů, které jsou získávány od mladých a zdravých dárek. Naše centrum má velmi stabilně a silně rozvinutý program dárcovství oocytů. Díky tomuto programu mohla vzniknout tato diplomová práce.

Tím, že bylo v práci použito darovaných oocytů, se podařilo snížit vliv ženského faktoru, který by mohl zasáhnout do procesu fertilizace a dalšího vývoje embrya. Do práce byly zahrnuty případy, ve kterých byl použit čerstvý ejakulát. Kryokonzervované spermie byly vyřazeny, abychom vyloučili možný vliv kryokonzervace.

Do studie byly zařazeny vzorky ejakulátů s výsledkem v normálních hodnotách nebo s výsledkem, který se v některém z vyšetřovaných parametrů odlišoval od normálních hodnot.

Průměrný věk dárekyně byl 22,74 let. Tento věk se shoduje s doporučeným věkem v článku z roku 2002, který doporučuje věk dárekyně oocytů nižší než 35 let. [33]

Po provedení injekce spermií do oocytů se následující den hodnotila úspěšnost fertilizace. Naše výsledky ukázaly, že pohyblivost spermií nemá vliv na fertilizaci a stejný výsledek ukazuje studie z roku. [34] Je zajímavé, že v nejtěžší kategorii OATSP, bylo oplozeno poměrně vysoké množství oocytů, může to však být způsobeno faktem, že u této kategorie byla k oplození volena technika IMSI.

Dále bylo v práci sledováno množství blastocyst, které vznikly oplozením darovaných oocytů. Nejvíce blastocyst bylo získáno v kategorii OSP. Všechny kvalitní blastocysty byly kryokonzervovány metodou rychlého mražení – vitifikací. A po

hormonální stimulaci příjemkyně byly tyto blastocysty po rozmražení transferovány – kryoembryotransfer.

Modulátorem kvality spermií byla technika ICSI/IMSI. Vysoká selektivita této techniky je založena na výběru té nejkvalitnější spermie z celého objemu zpracovaného ejakulátu. Je tady faktem, že u nejhorší kvality spermioqramu – OATSP lze vybrat spermie schopné oplození. Vzhledem k oplození oocytů touto technikou nelze přesně prokázat vliv kvality spermioqramu na *in vitro* fertilizaci, protože i u pacientů se špatným spermioqramem lze *in vitro* vykultivovat z oplozených oocytů dostatečný počet kvalitních blastocyst. Z této práce vyplývá, že technika ICSI/IMSI je vhodná pro muže s diagnostikovanou poruchou ve spermioqramu. Zároveň výsledky této práce přinášejí fakt, že klasický spermioqram nemá vysokou specifitu. Naproti tomu, Host et al. ve své studii uvádí přímý vztah mezi kvalitou spermií a počtem oplozených oocytů. [35]

Další částí této studie byla snaha o porovnání techniky ICSI a IMSI. K porovnání mezi těmito technikami bylo použito oocytů dárkyň a spermií dárců, to proto, abychom zanedbali vliv ženského a andrologického faktoru. Dárci byli rozděleni do dvou skupin podle techniky, kterou byla spermie do oocytů injikována.

V naší práci jsme nezjistili statisticky významný rozdíl mezi sledovanými technikami, čím se shodujeme se srovnávací studií Teixeira et al. [36] Ovšem zdá se, že technika IMSI má pozitivní vliv na vývoj embrya až do stádia blastocysty. Tuto skutečnost potvrzuje ve své i studii Vanderzwalmen Pierre et al. o vlivu vakuol ve spermiích na vývoj blastocysty. [37]

8 ZÁVĚR

Vliv kvality spermioqramu na *in vitro* fertilizaci, který jsme sledovali pomocí parametrů FR, UR, PR a IR nebyl u vybrané a sledované skupiny prokázán.

Výsledky této diplomové práce ukazují, že při aplikaci námi zvolených podmínek (darované oocyty, aktivní oplození intracytoplasmatickou injekcí) lze i u mužů s patologickým spermioqramem dosáhnout stejných výsledků během fertilizace *in vitro*, jako u mužů s fyziologickým spermioqramem.

Neprůkaznost patologického spermioqramu na IVF, může být vysvětlena použitím techniky ICSI/IMSI a darovaných oocytů. Tyto mikromanipulační techniky oplození jsou založeny na principu výběru nejlepší spermie z celého množství ejakulátu.

Aktivní oplození intracytoplasmatickou injekcí (ICSI/IMSI) je tedy nejvhodnější technikou k oplození oocytu a vzniku embrya v podmínkách *in vitro*.

Na fakt, že aktivní oplození injekcí spermie je nejvhodnější ukazuje i další část studie, které srovnala techniku ICSI se selektivnější technikou – IMSI. Získané výsledky ukazují na vyšší fertilizaci u techniky IMSI, ovšem tato data nejsou statisticky významná. To znamená, že výběr mikromanipulační techniky nemá přímý vliv na úspěšnost fertilizace.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1.] VACEK, Z. *Histologie a histologická technika*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-701-3201-9.
- [2.] TRÁVNÍK, P., ČECH, S. *Základy obecné a speciální embryologie pro klinické embryology*. Vyd. 1. Brno: YBUX, 2011. Věda (YBUX). ISBN 978-80-904697-0-9.
- [3.] TALWAR, P. *Manual of assisted reproductive technologies and clinical embryology*. 1st ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2012. Věda (YBUX). ISBN 93-502-5506-5.
- [4.] ELDER, K., DALE, B. *In vitro fertilization*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2000. ISBN 05-217-7863-8.
- [5.] HOLDCRAFT, R. W., BRAUN, R. E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology*. 2004, **27**(6), 335-342.
- [6.] SHARPE, R., et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 2003, **125**(6), 769-784.
- [7.] GRAY, H. *Anatomy of the human body*. 20th ed. New York: Bartleby.com, 2000. ISBN 15-873-4102-6.
- [8.] CHAFFEY, N. A., et al. *Molecular biology of the cell*. 4th edn.
- [9.] JONGE, Ch. J., BARRATT, C. *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration*. New York: Cambridge University Press, c2006. ISBN 978-0-521-85397-2.
- [10.] KRUGER, T. F., FRANKEN, D. R. *Atlas of human sperm morphology evaluation*. London: Taylor, 2004. ISBN 18-421-4277-1.

- [11.] SHARLIP, I. D., et al. Best practice policies for male infertility. *Fertility and sterility*. 2002, **5**(77), 873-882.
- [12.] HARRIS, I. D., et al. Fertility and the aging male. *Reviews in urology*, 2011, 13.4: e184.
- [13.] POONGOTHAI, J. E. N. S., et al. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*, 2009, 50.4: 336-347.
- [14.] KRAUSZ, C., GIACHINI, C. *Genetic Risk Factors in Male Infertility*. ISBN 10.1080/01485010701271786.
- [15.] OLIVA, R. Protamines and male infertility. *Human reproduction update*. 2006, 417-435.
- [16.] MOSTAFA, T. Cigarette smoking and male infertility. *Journal of Advanced Research*. 2010, 169-254.
- [17.] PÉREZ-CRESPO, M., et al. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development*. 2008, 40-47.
- [18.] AGARWAL, A., SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international*. 2005, **4**(95), 503-507.
- [19.] DIEMER, T., et al. Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia*. 2006, **35**(5), 283-287.
- [20.] TESARIK, J., MENDOZA, C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Human Reproduction*, 1996, 11.4: 772-779.

- [21.] VANDERZWALMEN, P., et al. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolema. *Human Reproduction*, 1996, 11.3: 540-547.
- [22.] JORIS, H., et al. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human Reproduction*. 1998, **13**(suppl 1): 76-86.
- [23.] WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. c2010. 5th ed. Geneva: World Health Organization, xiv, 271p. ISBN 92-415-4778-2
- [24.] JAROW, J. Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation. *The journal of urology*. 2005, 1437-1437
- [25.] THOMPSON, I. E. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*.
- [26.] ZOLLNER, K. P., et al. Hat die Ejakulation in Medium einen Effekt auf die Schwangerschaftsrate bei der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion bei Patienten mit schwerer Oligoasthenoteratozoospermie? Ergebnisse einer retrospektiven Analyse. *Journal für Urologie und Urogynäkologie*, 2002, 9.2: 12-18.
- [27.] WÜRFEL, W. Methoden der assistierten Reproduktion bei andrologischen Indikationen. *Blickpunkt der Mann*, 2007, 5.1: 4-11.
- [28.] JORIS, H., et al. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human Reproduction*. 1998, **13**(suppl 1): 76-86.
- [29.] SILBER, S. J. Intracytoplasmic sperm injection today: a personal review. *Human Reproduction*. 1998-04-01, vol. 13, suppl 1, s. 208-218.
- [30.] DE VOS, A., et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a critical and evidence-based review. *Basic and Clinical Andrology*. 2013, **13**.
- [31.] THOMPSON, I. E. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*[online]. 1997, **277**(16), 1328.

- [32.] JORGENSEN, N., et al. *Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men.*
- [33.] ESHRE TASK FORCE ON ETHICS AND LAW. III. Gamete and embryo donation. *Human Reproduction.* 2002, **17**(5), 1407-1408.
- [34.] CHYE, N. S., et al. Effect of sperm motility on human embryo quality in in vitro fertilization. *Molecular reproduction and development.* 1986, **1**(15), 35-42.
- [35.] HOST, E., et al. Sperm morphology and IVF, Embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Krüger's strict criteria. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 1991, (6), 526-529.
- [36.] TEIXEIRA, D. M., et al. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2013, 25;7:CD010167.
- [37.] VANDERZWALMEN, P., et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reproductive BioMedicine Online.* 2008, **17**(5), 617-627.
- [38.] www.embryology.ch/images/cimggametogen/03spermato/c3e_spermatogenese.gif
- [39.] www.embryology.ch/images/imgmultuse/c3c_stadien.jpg
- [40.] www.embryology.ch/images/cimggametogen/03spermato/c3i_spermium.gif
- [41.] www1.fs.cvut.cz/stretech/2009/pdf/1023.pdf
- [42.] wordpress.p193701.webspaceconfig.de/wp-content/uploads/ET1.jpg

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Průběh spermatogenese.	9
Obrázek 2: Histologická stavba semenotvorného kanálku.	10
Obrázek 3: Morfologický popis spermie.	12
Obrázek 4: Odchylky v morfologii hlavičky.	13
Obrázek 5: Odchylky v krčku a střední části.	13
Obrázek 6: Odchylky v morfologii bičíku.	14
Obrázek 7: Miska pro odběr oocytů.	17
Obrázek 8: Miska pro denudaci oocytů.	18
Obrázek 9: Oocyt po OPU.	19
Obrázek 10: Oocyty po denudaci (zleva: GV, MI, MII).	19
Obrázek 11: Obarvená spermie s normální morfologií.	22
Obrázek 12: Správně oplozené oocyty (2PN).	25
Obrázek 13: Embrya den 2.	26
Obrázek 14: Kompaktovaná morula.	27
Obrázek 15: Blastocysta 3AA.	29
Obrázek 16: Blastocysty (zleva: 5AA, 4AB).	29
Obrázek 17: Blastocysty (6AA, 5AA, 5AA).	29
Obrázek 18: Embryo před AH.	30
Obrázek 19: Embryo po AH.	31
Obrázek 20: Embryotransfer.	32
Obrázek 21: Mikromanipulační miska pro ICSI/IMSI.	34
Obrázek 22: ICSI/IMSI.	35
Obrázek 23: Spermie 1. třídy.	37
Obrázek 24: Spermie 2. třídy.	37
Obrázek 25: Spermie 3. třídy.	37

11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Hodnocení oocytů po denudaci.	18
Tabulka 2 Normální hodnoty spermioqramu dle standardů WHO, 5. edice.	20
Tabulka 3 Hodnocené parametry spermioqramu dle WHO.	21
Tabulka 4 Kritéria pohybu spermií.	21
Tabulka 5 Definice nejčastěji používaných pojmů k vyjádření konečného výsledku spermioqramu.	23
Tabulka 6 Hodnocení fertilizace.	25
Tabulka 7 Význam symbolů v hodnocení kvality embryí den 2 a den 3.	26
Tabulka 8 Hodnocení embryí ve stádiu blastocysty.	28
Tabulka 9 Morfologická selekce spermií podle jednotlivých tříd.	36
Tabulka 10 Sledované hodnoty žen.	39
Tabulka 11 Sledované hodnoty mužů.	39
Tabulka 12 Sledované hodnoty dárců.	39
Tabulka 13 Rozdělení mužů na kontrolní a sledovanou skupinu.	40
Tabulka 14 Rozdělení mužů do skupin podle výsledku SPG.	40
Tabulka 15 Přidělení darovaných oocytů k jednotlivým kategoriím výsledku spermioqramu.	41
Tabulka 16 Vliv jednotlivých kategorií spermioqramů na fertilizaci in vitro.	42
Tabulka 17 Počet získaných blastocyst u jednotlivých kategorií SPG.	42
Tabulka 18 Sledované parametry u kontrolní a sledované skupiny.	43
Tabulka 19 Sledované parametry u jednotlivých výsledků SPG.	44
Tabulka 20 Srovnání techniky ICSI a IMSI na základě výsledku FR.	44

12 PŘÍLOHY

Poř. čis	CYKLU	Počet o	OOCYTY	SPERMIE	IKA C	KULTIVACE	TRAN	TEHOTENSTVÍ	POZIV.						
										ok dárky	Počet o	Věk mu	Výsled	ICSI/IMS	Počet n
1.	KRYO 1	23	26	22	52 OSP	IMSI	17	77,27	15	88,24 5B	1	1	100%	100%	PGD
2.	KRYO 1	19	24	19	44 ASP	IMSI	9	47,37	6	66,67 5AB, 5B	0	0	0%	0%	PGD
3.	KRYO 1	19	18	16	52 OASP	IMSI	12	75	9	75 BEZ ET	0	0	0%	0%	PGD
4.	KRYO 1	22	13	11	46 NSP	ICSI	9	81,82	6	66,67 5AB	1	1	100%	100%	naroze
5.	KRYO 1	25	16	9	49 OSP	IMSI	6	66,67	6	100 5AB	1	1	100%	100%	neroze
6.	KRYO 1	24	12	12	53 NSP	IMSI	12	100	7	58,33 4BB	0	0	0%	0%	h n a w z
7.	KRYO 1	26	20	16	44 ASP	ICSI	10	62,5	6	60 5AA, 5A	0	0	0%	0%	
8.	KRYO 1	28	15	10	45 OASP	IMSI	7	70	6	85,71 5AB	1	1	100%	100%	
9.	KRYO 2	30	20	16	47 NSP	IMSI	7	43,75	6	85,71 5AB	1	1	100%	100%	naroze
10.	KRYO 2	20	27	21	51 ASP	IMSI	19	90,48	12	63,16 5AB	1	1	100%	100%	
11.	KRYO 1	22	19	18	40 NSP	IMSI	13	72,22	4	30,77 5BB, 5B	2	2	100%	100%	naroze
12.	KRYO 3	18	34	21	42 NSP	IMSI	15	71,43	9	60 5AB, 5B	0	0	0%	0%	
13.	KRYO 1	26	28	14	49 NSP	IMSI	12	85,71	4	33,33 5AB	1	1	100%	100%	naroze
14.	KRYO 1	25	10	8	54 ASP	IMSI	8	100	6	75 5BB	1	1	100%	100%	
15.	KRYO 1	30	21	17	48 OSP	ICSI	9	52,94	2	22,22 5BB	1	1	100%	100%	naroze
16.	KRYO 1	22	12	12	47 NSP	IMSI	11	91,67	8	72,73 5BB, 3B	1	1	100%	50%	
17.	KRYO 1	19	22	17	47 NSP	ICSI	13	76,47	6	46,15 5AA	1	1	100%	100%	
18.	KRYO 1	19	23	22	47 NSP	IMSI	18	81,82	8	44,44 5AB	1	1	100%	100%	abotru
19.	KRYO 1	18	22	21	41 NSP	IMSI	14	66,67	2	14,29 5AB, FB	1	1	50%	50%	abotrti
20.	KRYO 1	24	12	10	46 OASP	IMSI	7	70	5	71,43 5AA	0	0	0%	0%	
21.	KRYO 1	27	17	14	45 NSP	IMSI	10	71,43	6	60 5AB	0	0	0%	0%	
22.	KRYO 1	22	18	16	46 NSP	IMSI	13	81,25	9	69,23 6AB	0	0	0%	0%	
23.	KRYO 1	25	17	15	35 ASP	ICSI	3	20	3	100 5AB	1	1	100%	100%	naroze
24.	KRYO 1	22	18	12	48 TSP	IMSI	11	91,67	6	54,55 5AB, 6A	0	0	0%	0%	
25.	KRYO 1	23	13	11	49 ATSP	IMSI	10	90,91	5	50 5AB, 6A	0	0	0%	0%	
26.	KRYO 1	25	14	13	46 NSP	IMSI	12	92,31	9	75 5AA	1	1	100%	100%	abotru
27.	KRYO 1	20	26	16	35 NSP	IMSI	14	87,5	9	64,29 5AB, 5B	1	1	50%	50%	naroze
28.	KRYO 1	20	11	9	45 OASP	IMSI	8	88,89	8	100 5AA, 5A	0	0	0%	0%	PGD
29.	KRYO 2	21	17	12	51 NSP	IMSI	10	83,33	7	70 6AB	1	1	100%	100%	abotru
30.	KRYO 1	23	34	23	40 ASP	IMSI	10	43,48	4	40 5AA, 5A	0	0	0%	0%	
31.	KRYO 1	30	20	9	56 NSP	IMSI	6	66,67	4	66,67 5AB	0	0	0%	0%	
32.	KRYO 1	22	19	18	39 OASP	IMSI	13	72,22	4	30,77 5AB	0	0	0%	0%	
33.	KRYO 1	27	23	15	45 NSP	IMSI	7	46,67	2	28,57 5AB	1	0	0%	100%	
34.	KRYO 1	20	13	12	50 ASP	IMSI	6	50	5	83,33 5AB	1	1	100%	100%	naroze
35.	KRYO 1	26	17	16	47 OATSP	IMSI	13	81,25	12	92,31 5AA	0	0	0%	0%	
36.	KRYO 1	26	13	10	50 NSP	IMSI	10	100	5	50 5AB	1	1	100%	100%	porod
37.	KRYO 1	30	24	18	44 NSP	ICSI	16	88,89	14	87,5 5AB	1	1	100%	100%	porod
38.	KRYO 1	21	18	16	44 NSP	IMSI	12	75	7	58,33 4AB, 4B	1	1	50%	50%	naroze
39.	KRYO 1	20	17	13	51 OATSP	ICSI	7	53,85	3	42,86 5AB	1	0	0%	100%	
40.	KRYO 1	25	17	15	42 OASP	IMSI	10	66,67	6	60 5AB	1	1	100%	100%	abotru
41.	KRYO 1	27	19	14	33 NSP	IMSI	13	92,86	9	69,23 5AB, 5B	2	2	100%	100%	naroze
42.	KRYO 1	25	20	18	41 NSP	IMSI	15	83,33	10	66,67 4AB, 4B	1	1	50%	50%	
43.	KRYO 1	26	27	23	47 ASP	IMSI	20	86,96	10	50 5AB, 5B	0	0	0%	0%	
44.	KRYO 1	21	21	15	53 NSP	IMSI	12	80	8	66,67 5BB	0	0	0%	0%	
45.	KRYO 1	22	20	18	33 ASP	IMSI	11	61,11	8	72,73 4AB	1	1	100%	100%	naroze
46.	KRYO 1	20	17	9	45 ASP	ICSI	2	22,22	2	100 5AB, 5B	1	1	50%	50%	porod,
47.	KRYO 1	18	13	13	46 NSP	ICSI	8	61,54	4	50 5BB, FB	0	0	0%	0%	
48.	KRYO 1	19	11	11	52 OASP	ICSI	10	90,91	5	50 5AB, 5A	1	1	50%	50%	naroze
49.	KRYO 1	19	17	14	33 ASP	IMSI	9	64,29	4	44,44 5AB	1	1	100%	100%	naroze
50.	KRYO 1	22	7	7	27 TSP	IMSI	6	85,71	2	33,33 4BB, 4B	0	0	0%	0%	
51.	KRYO 1	23	19	16	43 NSP	IMSI	15	93,75	4	26,67 5AB	1	0	0%	100%	
52.	KRYO 1	29	22	16	44 OSP	IMSI	14	87,5	10	71,43 5AB	1	0	0%	100%	
53.	KRYO 1	26	22	15	39 ASP	IMSI	12	80	10	83,33 5AB, 5A	2	2	100%	100%	naroze
54.	KRYO 1	29	18	14	41 TSP	IMSI	10	71,43	8	80 5BB, 6A	0	0	0%	0%	
55.	KRYO 1	20	17	14	45 OATSP	IMSI	12	85,71	6	50 5BB	1	0	0%	100%	
56.	KRYO 1	18	20	16	58 OASP	IMSI	11	68,75	4	36,36 5BB	1	1	100%	100%	naroze
57.	KRYO 1	19	10	8	43 NSP	IMSI	8	100	5	62,5 5AB	1	1	100%	100%	
58.	KRYO 1	27	31	22	55 OASP	IMSI	17	77,27	3	17,65 5AB	0	0	0%	0%	
59.	KRYO 1	27	16	16	48 NSP	IMSI	13	81,25	7	53,85 5AB, 5B	2	2	100%	100%	
60.	KRYO 1	22	18	15	31 NSP	IMSI	14	93,33	9	64,29 5AB, 5A	1	0	0%	50%	
61.	KRYO 3	30	19	16	49 NSP	IMSI	14	87,5	9	64,29 5AA	0	0	0%	0%	
62.	KRYO 1	26	13	10	46 OATSP	IMSI	10	100	5	50 5AB, 5A	2	2	100%	100%	naroze
63.	KRYO 2	26	19	18	45 ASP	IMSI	14	77,78	11	78,57 5AB	1	1	100%	100%	naroze
64.	KRYO 1	18	15	13	45 OSP	IMSI	10	76,92	4	40 5BB, 5B	1	0	0%	100%	
65.	KRYO 1	19	13	11	50 NSP	IMSI	11	100	4	36,36 5AB	0	0	0%	0%	
66.	KRYO 1	18	18	17	47 NSP	IMSI	13	76,47	4	30,77 5AB	1	1	100%	100%	
67.	KRYO 1	19	16	15	39 NSP	IMSI	14	93,33	12	85,71 5AB	1	1	100%	100%	
68.	KRYO 1	19	22	17	45 NSP	IMSI	14	82,35	8	57,14 5AB	1	1	100%	100%	naroze
69.	KRYO 1	20	20	17	49 NSP	IMSI	13	76,47	9	69,23 5AB	1	1	100%	100%	naroze
70.	KRYO 1	20	28	18	43 NSP	IMSI	16	88,89	11	68,75 5AB	1	1	100%	100%	naroze
71.	KRYO 1	21	26	22	43 OSP	IMSI	17	77,27	9	52,94 5BB	1	1	100%	100%	naroze
72.	KRYO 1	21	22	15	56 ASP	IMSI	12	80	9	75 5AB, 5B	2	0	0%	100%	
73.	KRYO 1	21	20	15	38 NSP	IMSI	14	93,33	7	50 5AB, 5B	2	2	100%	100%	
74.	KRYO 1	20	15	15	44 NSP	IMSI	12	80	6	50 5AB, 5A	1	1	50%	50%	
75.	KRYO 1	20	11	9	52 OASP	IMSI	7	77,78	2	28,57 5AB, 5B	0	0	0%	0%	
76.	KRYO 1	22	26	13	44 NSP	IMSI	11	84,62	8	72,73 5AB, 5A	1	1	50%	50%	abotru
77.	KRYO 2	26	15	12	48 NSP	IMSI	11	91,67	6	54,55 5AB, FB	1	0	0%	50%	
78.	KRYO 1	25	20	17	37 NSP	IMSI	11	64,71	5	45,45 6BB, 6B	1	1	50%	50%	naroze
79.	KRYO 1	28	13	12	41 OATSP	ICSI	6	50	1	16,67 5AB	1	0	0%	100%	spatna
80.	KRYO 1	29	16	12	42 NSP	IMSI	9	75	7	77,78 5AB	1	0	0%	100%	
81.	KRYO 1	18	20	16	50 NSP	IMSI	13	81,25	4	30,77 5AB, 5A	0	0	0%	0%	
82.	KRYO 1	19	30	17	33 OSP	IMSI	12	70,59	5	41,67 6BB, 6B	1	1	50%	50%	naroze
83.	KRYO 1	19	27	18	32 NSP	IMSI	17	94,44	4	23,53 5BB, FB	1	1	50%	50%	naroze
84.	KRYO 1	20	12	12	44 TSP	IMSI	10	83,33	6	60 5AB, 5B	0	0	0%	0%	
85.	KRYO 1	22	25	19	51 OATSP	IMSI	14	73,68	9	64,29 5AB, 5A	2	0	0%	100%	
86.	KRYO 2	23	19	12	47 TSP	IMSI	11	91,67	4	36,36 5BB	0	0	0%	0%	
87.	KRYO 1	20	21	17	48 NSP	IMSI	14	82,35	5	35,71 5AB	1	1	100%	100%	naroze
88.	KRYO 1	21	22	18	47 OATSP	IMSI	13	72,22	7	53,85 4AA	0	0	0%	0%	spatna
89.	KRYO 1	25	26	23	42 OASP	IMSI	16	69,57	11	68,75 5AB, 5A	0	0	0%	0%	
90.	KRYO 1	26	18	15	56 OATSP	IMSI	14	93,33	6	42,86 4AA	1	0	0%	100%	
91.	KRYO 1	20	17	15	50 NSP	IMSI	10	66,67	5	50 5AB, 5A	2	2	100%	100%	naroze
92.	KRYO 2	23	16	15	48 OSP	IMSI	11	73,33	11	100 5AB	1	0	0%	100%	
93.	KRYO 1	22	18	15	53 OASP	IMSI	13	86,67	6	46,15 5AB, 6B	1	0	0%	50%	
94.	KRYO 1	21	17	12	48 OASP	IMSI	11	91,67	5	45,45	0	0	0%	0%	BEZ ET
95.	KRYO 1	20	19	15	43 OTSP	IMSI	8	53,33	2	25 5AB, 6A	2	1	50%	100%	naroze
96.	KRYO 1	28	27	7	34 OASP	IMSI	5	71,43	4	80 5BB, 5B	2	1	50%	100%	nar

SPERMIOGRAM											Patologie	Závěr dle
Poř. číslo	Věk muže	Objem ej.	Konc. (ml)	Celková	Motilita (a)	Motilita (%)						
						a	b	c	d			
1.	52	2,3	7	50	40	20	20	10	50	80% OSP		
2.	44	3,2	23	13	22	0	22	22	65	90% ASP		
3.	52	1,9	10	20	20	5	15	0	80	95% OASP		
4.	46	2,8	25	68	44	12	32	24	32	21% NSP		
5.	49	2,5	9	35	30	20	10	5	65	80% OSP		
6.	53	4,5	108	72	60	34	26	12	28	32% NSP		
7.	44	1,5	15	10	5	0	5	5	90	75% ASP		
8.	45	2	1	20	15	5	10	5	80	96% OASP		
9.	47	2,5	75	70	60	40	20	10	30	80 NSP		
10.	51	4,1	32	50	25	5	20	25	50	75 ASP		
11.	40	3	36	59	42	3	39	17	41	80 NSP		
12.	42	1,4	41	83	42	11	31	41	17	85 NSP		
13.	49	2,8	32	83	42	11	31	41	17	80 NSP		
14.	54	1,9	70	15	5	0	5	10	85	95 ASP		
15.	48	2,2	4	38	32	0	32	6	62	80 OSP		
16.	47	3	24	64	60	0	60	4	36	68 NSP		
17.	47	2,1	50	60	50	20	30	10	40	80 NSP		
18.	47	4	66	40	35	10	25	5	60	80 NSP		
19.	41	3	40	60	50	30	20	10	40	70 NSP		
20.	46	5	10	50	30	0	30	20	50	90 OASP		
21.	45	1,7	60	50	40	10	30	10	50	66 NSP		
22.	46	1,3	15	50	40	10	30	10	50	95 NSP		
23.	35	6	45	50	30	10	20	20	50	70 ASP		
24.	48	1,8	60	85	65	5	60	20	15	97 TSP		
25.	49	2	20	40	15	5	10	25	60	100 ATSP		
26.	46	2,2	30	75	65	45	20	10	25	60 NSP		
27.	35	1,5	100	50	40	20	20	10	50	60 NSP		
28.	45	2	6	20	15	5	10	5	80	95 OASP		
29.	51	3	35	40	35	10	25	5	60	75 NSP		
30.	40	2,8	52	40	20	10	10	20	60	66 ASP		
31.	56	1,5	72	60	50	15	35	10	40	80 NSP		
32.	39	4,8	14	30	25	10	15	5	70	85 OASP		
33.	45	4	36	45	40	15	25	5	55	75 NSP		
34.	50	2,2	145	25	20	10	10	5	75	85 ASP		
35.	47	1	3	20	15	5	10	5	80	97 OATSP		
36.	50	2	200	75	55	40	15	20	25	45 NSP		
37.	44	4,2	16	56	46	1	45	10	44	60 NSP		
38.	44	1,2	120	60	52	24	28	8	40	48 NSP		
39.	51	4	3	9	2	0	2	7	91	98 OATSP		
40.	42	1	10	20	10	0	10	10	80	90 OASP		
41.	33	4	74	68	46	0	46	22	32	70 NSP		
42.	41	2,2	15	60	42	3	39	18	40	85 NSP		
43.	47	2,4	35	30	25	5	20	5	70	80 ASP		
44.	53	3,6	30	40	35	15	20	5	60	70 NSP		
45.	33	4,8	45	5	5	0	5	0	95	90 ASP		
46.	45	4,4	31	47	22	6	16	25	53	50 ASP		
47.	46	1,6	80	49	36	0	36	13	51	70 NSP		
48.	52	2,5	10	30	25	5	20	5	70	70 OASP		
49.	33	1	15	25	15	5	10	10	75	90 ASP		
50.	27	4,2	52	62	46	22	24	16	38	97 TSP		
51.	43	5,2	73	45	35	5	30	10	55	80 NSP		
52.	44	2,8	6	40	35	15	20	5	60	80 OSP		
53.	39	4,9	26	35	30	5	25	5	65	60 ASP		
54.	41	2,4	29	55	44	0	44	11	45	98 TSP		
55.	45	1	3	15	15	10	5	0	85	97 OATSP		
56.	58	1,2	6	43	21	0	21	22	57	70 OASP		
57.	43	5	22	79	62	12	50	17	21	40 NSP		
58.	55	1	2	20	15	10	5	5	80	90 OASP		
59.	48	1	120	50	40	10	30	10	50	85 NSP		
60.	31	2,6	60	72	38	0	38	34	28	60 NSP		
61.	49	1,2	200	80	70	20	50	10	20	70 NSP		
62.	46	1,6	5	20	15	10	5	5	80	99 OATSP		
63.	45	1,4	37	73	31	0	31	42	27	60 ASP		
64.	45	1,5	2	50	50	50	0	0	50	85 OSP		
65.	50	2,2	65	60	45	10	35	15	40	90 NSP		
66.	47	1,8	16	40	35	15	20	5	60	70 NSP		
67.	39	2,3	25	60	40	0	40	20	40	60 NSP		
68.	45	2,1	62	45	35	15	20	10	55	60 NSP		
69.	49	4,2	22	55	45	10	35	10	45	65 NSP		
70.	43	1,9	65	48	43	20	23	5	52	70 NSP		
71.	43	1,8	3	67	40	0	40	27	33	70 OSP		
72.	56	2	58	48	31	0	31	17	52	75 ASP		
73.	38	4,2	15	40	30	5	25	10	60	75 NSP		
74.	44	3	86	60	50	15	35	10	40	60 NSP		
75.	52	2,2	14	30	25	10	15	5	70	90 OASP		
76.	44	2,1	46	71	64	1	63	7	29	87 NSP		
77.	48	1,4	54	45	35	15	20	10	55	75 NSP		
78.	37	1,4	39	67	41	0	41	26	33	70 NSP		
79.	41	2,4	10	73	27	3	24	46	27	97 OATSP		
80.	42	1	60	70	60	40	20	10	30	80 NSP		
81.	50	1,8	52	56	48	22	26	8	44	89 NSP		
82.	33	3	13	40	40	30	10	0	60	80 OSP		
83.	32	2	54	98	94	6	88	4	2	70 NSP		
84.	44	2,6	27	44	35	1	34	9	56	99 TSP		
85.	51	2	4	15	12	2	10	3	85	98 OATSP		
86.	47	1,2	177	59	54	2	52	5	41	99 TSP		
87.	48	4	46	45	35	5	30	10	55	81 NSP		
88.	47	2,2	8	27	11	0	11	16	74	99 OATSP		
89.	42	3	7,5	33	23	5	18	10	67	85 OASP		
90.	56	2	2	12	2	1	1	10	98	100 OATSP		
91.	50	3,4	22	50	32	0	32	18	50	90 NSP		
92.	48	4	11	73	64	9	55	9	27	91 OSP		
93.	53	1	8	10	5	0	5	5	90	95 OASP		
94.	48	1	3	20	10	0	10	10	80	75 OASP		
95.	43	1,8	2	46	39	3	36	7	54	99 OTSP		
96.	34	2	12	60	30	5	25	30	40	60 OASP		
97.	51	0,9	33	40	22	0	22	18	60	98 ATSP		
98.	43	1,8	20	45	20	0	20	25	55	100 ATSP		
99.	36	1	3	55	40	15	25	15	45	66 OSP		
100.	47	2,6	66	30	25	10	15	5	70	85 ASP		

Poř. číslo	CYKLUS	OOCYTY		SPERMIE		TECHNIKA OPLOZENÍ	KULTIVACE				TRANSFER	TĚHOTENSTVÍ				POZN.
		Počet oocytů	Počet oocytů	Věk dárce	Výsledek sper		ICSI/IMSI	Počet normáln	FR	Počet blastoc		UR	Kvalita transf	HCG	Srd. Akce	
1.	KRYO				NSP	IMSI		63		66	588, 588				100	horší kvalita d
2.	KRYO	15	10	22	NSP	ICSI	7	70	4	57,14	5AB	1	1	100%	100%	
3.	KRYO	22	20	27	NSP	ICSI	16	80	11	68,75	5AB	1	1	100%	100%	
4.	KRYO	14	12	23	NSP	ICSI	9	75	5	55,56	5AB	1	1	100%	100%	narozen chlap
5.	KRYO	15	13	32	NSP	ICSI	9	69,23	6	66,67	5AA	0	0	0%	0%	narozeno děvč
6.	KRYO	16	14	26	NSP	ICSI	10	71,43	3	30	5AB	1	1	100%	100%	narozen chlap
7.	KRYO	21	15	23	NSP	ICSI	14	93,33	5	35,71	5AB, 5BB	2	0	0%	0%	100% abortus 7. týd
8.	KRYO	18	12	25	NSP	ICSI	7	58,33	5	71,43	5AB	1	1	100%	100%	
9.	KRYO	19	11	19	NSP	ICSI	10	90,91	6	60	588, 588	0	0	0%	0%	narozen chlap
10.	KRYO	22	15	32	NSP	ICSI	11	73,33	6	54,55	5AB	1	1	100%	100%	
11.	KRYO	17	15	26	NSP	IMSI	13	86,67	8	61,54	5AB, 5AB	1	0	0%	0%	50% narozeno děvč
12.	KRYO	13	10	32	NSP	IMSI	9	90	7	77,78	5AB	1	0	0%	100%	
13.	KRYO	13	10	25	NSP	IMSI	9	90	8	88,89	588, 588	2	1	50%	100%	
14.	KRYO	14	13	19	NSP	IMSI	13	100	11	84,62	5AA	1	1	100%	100%	horší kvalita d
15.	KRYO	11	9	31	NSP	IMSI	7	77,78	7	100	5AA	0	0	0%	0%	abortus 9. týd
16.	KRYO	10	9	27	NSP	IMSI	8	88,89	6	75	5AB	1	1	100%	100%	
17.	KRYO	13	7	20	NSP	IMSI	7	100	4	57,14	5AB, 588	0	0	0%	0%	
18.	KRYO	13	10	20	NSP	IMSI	7	70	0	0		0	0	0%	0%	
19.	KRYO	17	13	32	NSP	IMSI	11	84,62	10	90,91	5AB	1	1	100%	100%	oocytů s křehk
20.	KRYO	6	4	29	NSP	IMSI	3	75	2	66,67	588, 588	0	0	0%	0%	
21.	KRYO	12	11	24	NSP	IMSI	8	72,73	5	62,5	5AB, 5AB	2	0	0%	100%	narozen chlap
22.	KRYO	42	22	28	NSP	IMSI	21	95,45	11	52,38	5AB	0	0	0%	0%	narozen chlap
23.	KRYO	10	9	25	NSP	IMSI	9	100	9	100	5AA	1	1	100%	100%	narozeno děvč
24.	KRYO	30	19	31	NSP	IMSI	11	57,89	9	81,82	5AB	1	1	100%	100%	