

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Asistovaná reprodukce – in vitro fertilizace

Bakalářská práce

Kristýna Růžičková

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristýna Růžičková**  
Osobní číslo: **C18184**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Asistovaná reprodukce – *in vitro* fertilizace**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Seznamte se s literárními údaji, zabývající se asistovanou reprodukcí.  
Využijte například databázi Medline, Science Direct, apod.

Vypracujte přehlednou práci o asistované reprodukci a *in vitro* fertilizaci.  
Zaměřte se na možnosti *in vitro* fertilizace a možná rizika.

Diskutujte problematiku *in vitro* fertilizace a její budoucnost.

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.  
Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

LS.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 7. 2020

Kristýna Růžičková

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D. za vstřícný přístup a cenné rady při zpracovávání bakalářské práce. Děkuji také Mgr. Michalovi Kopčilovi za velmi užitečnou metodickou pomoc. V neposlední řadě své rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Práce se zaměřuje na proces asistované reprodukce, při kterém dochází k manipulaci se zárodečnými buňkami nebo s embryi, včetně jejich uchovávání, a to za účelem léčby neplodnosti ženy nebo muže. Podrobně jsou rozebrány jednotlivé fáze léčby neplodnosti metodou *in vitro* fertilizace. V práci jsou zahrnuty i rizika plynoucí z asistované reprodukce. Závěr práce je věnován budoucnosti *in vitro* fertilizace, včetně popisu nových technik.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

asistovaná reprodukce, *in vitro* fertilizace, neplodnost, vajíčko, spermie, embryo

## **TITLE**

Assisted reproduction - in vitro fertilization

## **ANNOTATION**

The work focuses on the process of assisted reproduction, in which germ cells or embryos are manipulated, including their storage, in order to treat infertility in women or men. The individual phases of infertility treatment by *in vitro* fertilization are discussed in detail. The work also includes the risks arising from assisted reproduction. The conclusion of the work is devoted to the future of *in vitro* fertilization, including a description of new techniques.

## **KEYWORDS**

assisted reproduction, *in vitro* fertilization, infertility, oocyte, sperm, embryo

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	10
ÚVOD .....	12
1 HISTORIE .....	13
1.1 Vývoj léčby neplodnosti .....	13
1.2 První dítě ze zkumavky .....	14
2 VYBRANÉ METODY ASISTOVANÉ REPRODUKCE .....	15
2.1 Intrauterinní inseminace .....	15
2.2 In vitro fertilizace .....	16
3 FARMAKOTERAPIE V ASISTOVANÉ REPRODUKCI .....	18
3.1.1 Léky pro zvýšení počtu zralých vajíček stimulací růstu folikulů .....	21
3.1.2 Léky pro zvýšení kvality vajíček .....	22
3.1.3 Léky k indukci ovulace .....	22
4 ODBĚR VAJÍČEK A SPERMATU .....	24
4.1 Odběr vajíček .....	24
4.2 Odběr spermatu .....	25
5 OPLOZENÍ VAJÍČEK .....	28
5.1 Konvenční kultivace .....	28
5.2 Intracytoplazmatická injekce spermie .....	28
5.3 Introcytoplazmatická injekce preselektované spermie .....	29
6 KULTIVACE EMBRYÍ .....	30
6.1 Vlastní kultivace embryí .....	30
6.2 Selektce embryí pro embryotransfer .....	31
7 GENETICKÉ VYŠETŘENÍ EMBRYA .....	33
7.1 Preimplantační genetické testování aneuploidií .....	33
7.2 Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění .....	35
7.3 Preimplantační genetické testování strukturních chromosomových vad .....	35
8 ASISTOVANÝ HATCHING .....	37
9 EMBRYOTRANSFER .....	39
10 KRYOKONZERVACE A VITRIFIKACE .....	41
10.1 Kryokonzervace embryí .....	41
10.2 Kryokonzervace vajíček .....	42

10.3	Kryokonzervace spermií .....	42
11	RIZIKA IN VITRO FERTILIZACE .....	44
11.1	Selhání léčby .....	44
11.2	Ovariální hyperstimulační syndrom .....	44
11.3	Komplikace při odběru vajíček .....	45
11.4	Vícečetné těhotenství .....	45
11.5	Mimoděložní těhotenství.....	45
12	BUDOUCNOST IN VITRO FERTILIZACE .....	47
12.1	Transplantace dělohy .....	47
12.2	„Designer babies“.....	48
12.3	Mitochondriální substituční terapie.....	48
	ZÁVĚR .....	50
	POUŽITÁ LITERATURA .....	51



## SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1</b> - Blastocysta je nejvyšší vývojové stádium časného embryonálního vývoje .....	13
<b>Obrázek 2</b> - Průběh mimotělního oplodnění metodou <i>in vitro</i> fertilizace.....	17
<b>Obrázek 3</b> - Časový harmonogram stimulačního protokolu s antagonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny .....	19
<b>Obrázek 4</b> - Časový harmonogram krátkého stimulačního protokolu s agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny .....	19
<b>Obrázek 5</b> - Časový harmonogram dlouhého stimulačního protokolu s agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny .....	20
<b>Obrázek 6</b> - Časový harmonogram dlouhého protokolu započatého z luteální fáze .....	20
<b>Obrázek 7</b> - Časový harmonogram dlouhého protokolu započatého z folikulární fáze .....	20
<b>Obrázek 8</b> - Punkce folikulů transvaginálně pod kontrolou ultrazvukem.....	24
<b>Obrázek 9</b> - Znázornění průběhu metody „swim-up“ .....	26
<b>Obrázek 10</b> - Znázornění místa odběru spermií při metodě MESA a TESE.....	27
<b>Obrázek 11</b> - Intracytoplazmatická injekce spermií .....	29
<b>Obrázek 12</b> - Zralá spermie se váže na hyaluronan.....	29
<b>Obrázek 13</b> - Prodloužená kultivace trvající pět dní .....	30
<b>Obrázek 14</b> - Vývoj embrya detekovaný „time-lapse“ technologií.....	32
<b>Obrázek 15</b> - Časová osa metody <i>in vitro</i> fertilizace s metodou sekvenování nové generace .....	34
<b>Obrázek 16</b> - Biopsie embrya .....	34
<b>Obrázek 17</b> - Způsoby provedení asistovaného „hatchingu“ .....	38
<b>Obrázek 18</b> - Zavedení embrya do dělohy katetrem .....	40
<b>Obrázek 19</b> - Kryopejeta .....	42
<b>Obrázek 20</b> - Uložení pejet v kryokontejneru s kapalným dusíkem .....	43
<b>Obrázek 21</b> - Hyperstimulovaný vaječník po terapii gonadotropiny .....	45
<b>Obrázek 22</b> - Typy mimoděložního těhotenství podle místa uhníždění oplozeného vajíčka..	46
<b>Obrázek 23</b> - Schéma znázorňující zúčastněné strany při transplantaci dělohy.....	47
<b>Obrázek 24</b> - Schematicky znázorněný postup při substituci mitochondrií .....	49

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AH	Asistovaný „hatching“ (usnadnění zahrnutí embrya)
AR	Asistovaná reprodukce
ART	Metody asistované reprodukce (z angl. assisted reproductive technology)
BRCA	Rakovina prsu (z angl. breast cancer)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
eSET	Elektivní přenos jednoho embrya (z angl. elective single embryo transfer)
ET	Embryotransfer
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FSH	Folikulostimulační hormon
GM	Geneticky modifikovaný
GnRH	Hormon uvolňující gonadotropin (z angl. gonadotropin-releasing hormone)
GnRH-a	Agonista hormonu uvolňující gonadotropin
GnRH-ant	Antagonista hormonu uvolňující gonadotropin
hCG	Lidský choriogonadotropin (z angl. human chorionic gonadotropin)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
hMG	Lidský menopauzální gonadotropin (z angl. human menopausal gonadotropin)
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermií (z angl. intracytoplasmic sperm injection)
IUI	Intrauterinní inseminace
IVF	<i>In vitro</i> fertilizace
LH	Lutropin
MESA	Mikrochirurgické odsátí spermií z nadvarlete (z angl. microsurgical epididymal sperm aspiration)
MST	Přenos komplexu chromosomů z vajíčka matky do vajíčka dárkyně (z angl. maternal spindle transfer)
NGS	Sekvenování nové generace (z angl. next-generation sequencing)
OHSS	Ovariálního hyperstimulačního syndromu (z angl. ovarian hyperstimulation syndrome)
OPU	Odběr vajíček z vaječníků (z angl. ovum pick-up)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PGS	Preimplantační genetický screening
PGT	Preimplantační genetické testování

PGT-A	Preimplantační genetické testování aneuploidií
PGT-M	Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění
PGT-SR	Preimplantační genetické testování strukturních chromozomových vad
PICSI	Intracytoplazmatická injekce preselektované spermie (z angl. preselected intracytoplasmic sperm injection)
rFSH	Rekombinantní folitropin
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
TESE	Extrakce spermií ze vzorku tkáně varlete (z angl. testicular sperm extraction)

# ÚVOD

Neplodnost postihuje v České republice přibližně 15 % párů v reprodukčním věku. O diagnóze neplodnosti se uvažuje po jednom roce pravidelného nechráněného pohlavního styku, po kterém nedošlo k otěhotnění. Léčba neplodnosti zahrnuje celou řadu variant a postupů, které se liší podle potřeb konkrétního páru. Asistovaná reprodukce by měla být až poslední možností v případech, kdy ostatní způsoby řešení selžou. Před začátkem léčby je třeba najít příčinu problému každého onemocnění, tedy i příčinu neplodnosti. Během diagnostiky je třeba absolvovat celou řadu vyšetření.

Cílem této práce je přehledně popsat jednotlivé zákroky, které jsou potřeba v průběhu podstoupení jednoho *in vitro* fertilizačního (IVF) cyklu. Práce je rozdělená na dílčí úseky představující nejdůležitější části pojednávané problematiky.

V práci shrnuji i nejčastěji se vyskytující komplikace, které jsou spojené s léčbou IVF. Pro umělé oplodnění platí stejná rizika jako u přirozeného těhotenství. Přesto může ojediněle dojít ke komplikacím jako u každého jiného zákroku. Pochopitelně je zvýšená pravděpodobnost mnohočetného těhotenství. Při přenosu dvou nebo více embryí do dělohy je totiž pravděpodobné, že se uchytí všechna a může nastat vícečetné těhotenství.

V závěru práce je popsána budoucnost IVF, která zahrnuje například techniky umožňující ženám bez dělohy zplodit vlastního potomka nebo zabránit přenosu dědičných mitochondriálních chorob. Nové techniky také začínají experimentovat s genetickou výbavou člověka. S nástrojem známého jako CRISPR (opakující se motivy DNA oddělené „náhodnými“ krátkými úseky, z angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) se upraví geny vzniklých embryí tak, aby případně narozené děti získaly mutaci, která by je ochránila například před nákazou virem HIV.

# 1 HISTORIE

## 1.1 Vývoj léčby neplodnosti

V roce 1779 Lazzaro Spallanzani, italský kněz, badatel a fyziolog experimentem prokázal, že spermie obsahují jádro s cytoplazmou a jsou nezbytné k oplodnění. Poprvé bylo také zjištěno, že se embryo vyvíjí v důsledku fyzického kontaktu mezi vajíčkem a spermií. Dalším důležitým poznatkem přispěl k vývoji embryologie Carl Ernst Von Baera, kdy v roce 1827 poprvé objevil savčí vajíčka. Zatímco se umělá inseminace zvířat stala rychle rostoucím průmyslovým odvětvím, trvalo několik let, než se tato technologie začala aplikovat na lidi. Jedenáct let po Spallanzaniho experimentu byl proveden první úspěšný pokus umělé inseminace u ženy. Skutečný začátek technologie asistované reprodukce (ART) však začal téměř o století později, kdy první zprávu o lidské umělé inseminaci zveřejnil Guttmacher (1943). Historie prvních pokusů o *in vitro* fertilizaci (IVF) sahá až do roku 1890, kdy profesor Walter Heape hlásil první případ transplantace embryí u králíků na univerzitě Cambridge. Koncem 19. století bylo oplodnění popsáno jako fúze buněčných jader samičího vajíčka a samčí spermie, kdy následně vytvořená buňka se může vyvíjet až do stadia blastocysty (Obr. 1), implantovat se a vést k těhotenství. O 80 let později Robert G. Edwards a Patrick Steptoe provedli úspěšnou IVF u člověka, což vedlo k narození Louise Joy Brownové [1].



**Obrázek 1** - Blastocysta je nejvyšší vývojové stádium časného embryonálního vývoje [2]

## 1.2 První dítě ze zkumavky

Narození prvního „dítěte ze zkumavky“ na světě, Louise Brownové, 25. července 1978 v Oldhamu, v severozápadní Anglii, představuje vyvrcholení dlouhodobého vědeckého výzkumu v reprodukční medicíně. Před rokem 1978 byly, podle lékařů, ženy bez funkčních vejcovodů považovány za sterilní. Pro přirozené oplodnění vajíčka spermií je nezbytný alespoň jeden zdravý vejcovod. V minulosti se proto mnoho žen s poškozenými vejcovody uchýlovalo k reparativní chirurgii nebo tuboplastice. Bohužel zákroky nebývaly úspěšné. V té době bylo oplodnění vajíček mimo lidské tělo, proces známý jako oplodnění *in vitro*, považováno za zcela experimentální a vedlo pouze k potratům a neúspěšnému mimoděložnímu těhotenství. Lesley Brown a její manžel John z města Bristol ve Velké Británii nedokázali během devíti let jejich manželství počít dítě. Lesley Brown měla následně diagnostikovány neprůchodné vejcovody a podstoupila bilaterální salpingostomii, která byla provedena bez úspěchu. V roce 1976 byl případ předán doktorovi Patricku Christopherovi Steptoeovi, gynekologovi v Oldhamově všeobecné nemocnici v Manchesteru. Doktor navrhl novou experimentální techniku, která by obcházela zmíněnou blokádu ve vejcovodech. Bez použití hormonální stimulace vaječnicků podstoupila Lesley Brown laparoskopické získání vajíček. Vajíčko bylo oplodněno mimo mateřský organismus, kdy k oplodnění byly použity spermie manžela a vzniklé embryo bylo přeneseno do dělohy. Těhotenství u paní Brownové se vyvíjelo zcela bez komplikací a 25. července 1978 přišla na svět císařským řezem Louise, která vážila 2,61 kilogramu. Po této zlomově důležité události Steptoe a Edwards a několik dalších tehdejších vědců tento klinický úspěch nejen úspěšně opakovali, ale pokračovali v jeho dalším zlepšování a zdokonalování. O čtyři roky později se narodila stejným způsobem i setra Louise, Natalie. Obě ženy jsou dnes matkami, čímž vyvrátily obavy lékařů, že při snažení o vlastní potomky, budou nutně potřebovat odbornou pomoc [3-6].

Průkopníkem umělého oplodnění v tehdejší Československu byl spolu s jeho týmem profesor Ladislav Pilka. Byl vůbec první v celém východním bloku, který se oboru asistované reprodukce věnoval. Nástroje potřebné pro odběr vajíčka si tehdy vyráběli sami. V České republice, resp. v tehdejší ČSSR se prvním dítětem ze zkumavky stal chlapec, který se narodil v roce 1982 v brněnské porodnici na Obilním trhu. Byl to první porod takto počatého dítěte ve střední a východní Evropě [7, 8].

## 2 VYBRANÉ METODY ASISTOVANÉ REPRODUKCE

### 2.1 Intrauterinní inseminace

Děložní krček přirozeně omezuje počet spermií, které vstupují do dělohy. To znamená, že pouze malé procento spermií v ejakulátu se skutečně dostane do vejcovodů. Nitroděložní neboli intrauterinní inseminace (IUI) je metoda asistované reprodukce, při které se spermie zavádějí přímo do děložní dutiny ženy v době ovulace. Jedná se o bezbolestný a jednoduchý zákrok, který se může provádět v přirozeném cyklu bez užívání léků, nebo po hormonální stimulaci vaječníků perorálními antiestrogeny nebo gonadotropiny. Výhodou této metody je především fakt, že nevyžaduje odběr vajíčka pro oplodnění *in vitro* a s tím spojenou celkovou anestezii [9-11].

Intrauterinní inseminace by měla být upřednostňována před invazivními a nákladnějšími technikami asistované reprodukce. Měla by být nabízena jako první volba léčby v případě nevysvětlitelné neplodnosti a lehčích formách mužské neplodnosti. Je indikována v případech cervikální neplodnosti, anovulace a endometriózy se zdravými vejcovody. Dalším důvodem indikace může být imunologický faktor neplodnosti. IUI je správná volba, pokud žena podstoupila operaci děložního hrdla nebo má neobvyklý tvar děložního čípku, který zabraňuje průchodu spermií. Při volbě vhodné terapie neplodnosti je nutné zvážit faktory, které mají vliv na pravděpodobnost otěhotnění po podstoupení IUI. Mezi tyto faktory patří věk ženy (do 35 let), délka trvání neplodnosti, stimulační protokol, etiologii neplodnosti, počet cyklů a načasování inseminace [9, 12-15].

Jednotlivé kroky této metody nejsou nijak složité. Při laboratorním zpracování ejakulátu dochází k jeho promytí, tzn. odstranění prostaglandinů a reaktivních sloučenin kyslíku (ROS). Prostaglandiny musí být ze vzorku spermatu odstraněny, protože způsobují těžké křeče dělohy. Ženy v některých případech užívají léky (perorálně nebo intravenózně), které způsobí dozrávání několika vajíček ve vaječnících najednou. Pokud se k stimulaci cyklu použijí orální antiestrogeny, žena užívá tablety po dobu 5 dnů. Když se použijí ke stimulaci cyklu gonadotropiny, žena obvykle dostává injekce po dobu 7 až 10 dnů. Přesné trvání stimulace však závisí na tom, který den cyklu u dané ženy je zahájen. V obou případech stimulace je léčba monitorována ultrazvukovým vyšetřením, aby se vyhodnotila ovariální odpověď. V případě, že se vyvinul jeden až tři folikuly na vhodnou velikost, obvykle s jedním dominujícím folikulem, podá se injekce lidského choriogonadotropinu (hCG), který vyvolá ovulaci. Inseminace připraveného spermatu je provedena o 24 až 36 hodin později. Do dělohy se zavede katétr (úzká trubice) a promytý vzorek spermatu se pomalu vstříkne. Obvykle je

tento postup bezbolestný, ale některé ženy mohou mít mírné křeče nebo zaznamenat krátkodobé špinění. Aby se však snížilo riziko vícenásobného těhotenství, nesmí být oplodnění provedeno, pokud se vyvinou více než tři folikuly nebo jsou pozorovány dva nebo více zralých folikulů. Před zvážením alternativní terapie, jako je IVF, mohou být provedeny čtyři až šest IUI cyklů. Metoda IUI nezvyšuje riziko vrozených vad. Pravděpodobnost vrozených vad u všech dětí je 2 až 4 %, ať už jsou koncipovány přirozeně nebo z IUI. Rovněž riziko vzniku infekce po IUI je malé [9, 10, 12, 15].

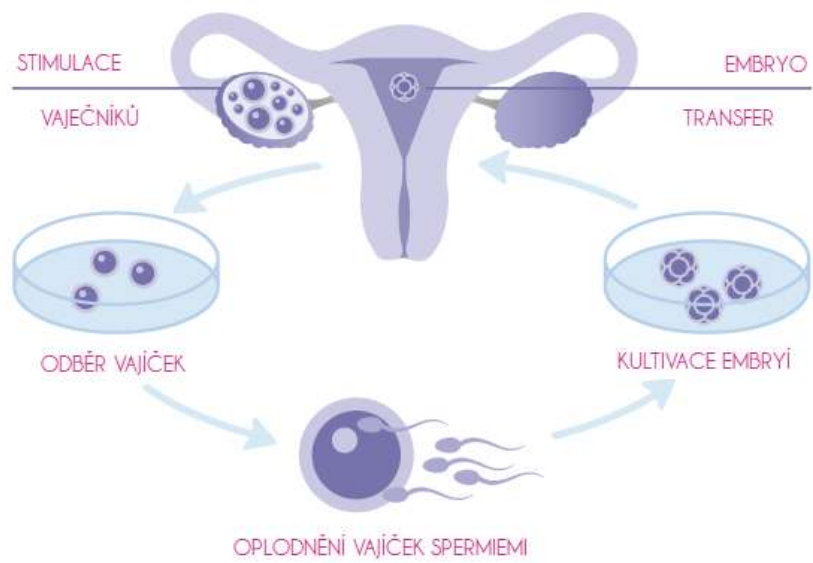
## 2.2 In vitro fertilizace

Termín IVF pochází z latiny a znamená "oplodnění ve zkumavce". Jedná se o metodu asistované reprodukce, která zahrnuje kombinování zralého vajíčka se spermií v laboratorní misce (Obr. 2). Spermie se naváže na povrch vajíčka na tzv. *zona pellucida* a během tzv. akrozomální reakce se postupně propracovává k membráně a splývá s vajíčkem, čímž dochází k oplození. Z dvou pohlavních buněk, které obsahovaly každá haploidní genetickou informaci, vzniká zygota s diploidním počtem chromozomů [16, 17].

Pokud se vajíčko oplodní a začne proces rýhování (násobné dělení oplozeného vajíčka), přemístí se vzniklé embryo do dělohy ženy, kde se implantuje do sliznice dělohy a dále se vyvíjí. IVF obchází vejcovody a je obvykle volbou léčby u žen, které mají poškozené nebo chybějící vejcovody. IVF lze provést za použití vlastních vajíček ženy a spermií partnera, nebo může zahrnovat vajíčka, sperma nebo embrya od známého nebo anonymního dárce. V některých případech může být zvolena varianta náhradní matky, žena, která má "cizí" embryo implantované do dělohy [18, 19].

IVF je nejúčinnější forma asistované reprodukce. Účinnost IVF metody závisí na mnoha faktorech, jako je například věk a příčina neplodnosti. IVF je časově náročná, finančně nákladná a invazivní. Pokud je do dělohy přeneseno více embryí, může IVF vést k těhotenství s více než jedním plodem (vícečetné těhotenství). Proces oplodnění *in vitro* se obecně dělí na tři základní kroky, indukci ovulace, oplodnění vajíček a vývoj embryí, která se přenášejí do dělohy [19, 20].





**Obrázek 2** - Průběh mimotělního oplodnění metodou *in vitro* fertilizace [21]

### 3 FARMAKOTERAPIE V ASISTOVANÉ REPRODUKCI

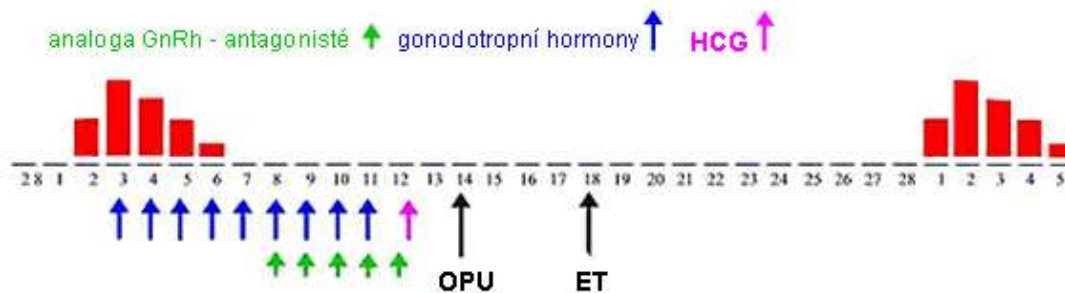
Úspěch IVF cyklů závisí na schopnosti získat dostačující počet zralých vajíček. Z toho důvodu hrají léky klíčivou úlohu v ART. Dostupnost rekombinantního folitropinu (rFSH), lutropinu (LH), lidského choriogonadotropinu (hCG), agonistů a antagonistů hormonu uvolňujícího gonadotropiny (GnRH) a luteální suplementace progesteronem umožňuje sestavit několik stimulačních protokolů, které se používají k ovariální hyperstimulaci. Před stimulací vaječnicků se někdy používá předběžná léčba kombinovanou perorální antikoncepční pilulkou, progestogenem nebo estrogenem. Zlepšuje to reakci na exogenní hormonální terapii, minimalizuje riziko tvorby ovariálních cyst a usnadňuje plánování stimulačních cyklů [10, 22].

Stimulační protokoly lze rozdělit na s antagonisty GnRH (GnRH-ant) a s agonisty GnRH (GnRH-a), protokol s GnRH-a se dále dělí na krátký a dlouhý. Důležité je při volbě stimulačního protokolu zohlednit věk pacientky, riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu a reakci pacientky na hormonální stimulaci v předchozích cyklech, které žena podstoupila [23].

#### **Stimulační protokol s antagonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny**

Tento protokol začíná vlastní přirozenou stimulací, která se může posílit aplikací FSH. Těsně před ovulací se podá antagonist. Antagonista blokuje rozpoznávání ovariálních stimulačních signálů mozkiem. Protokoly s antagonisty můžeme dále rozlišovat podle toho, zda se jejich podávání řídí velikostí folikulů, tzv. flexibilní protokol, nebo je jejich aplikace zahájena v předem určený den, tzv. fixní protokol [24, 25].

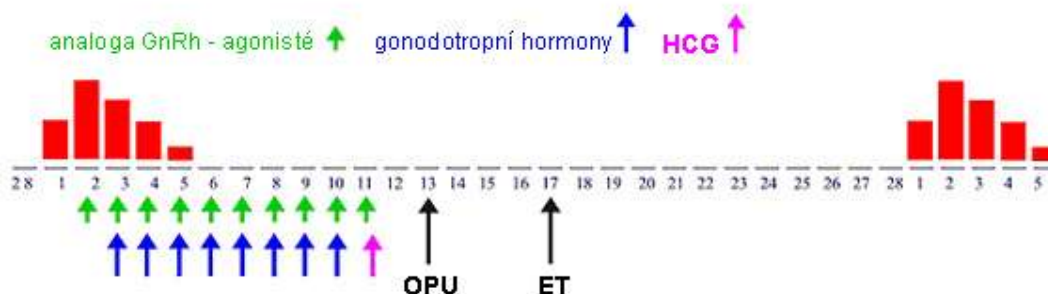
Od druhého nebo třetího dne menstruace se každý den aplikují gonadotropiny (Obr. 3). Šestý nebo sedmý den menstruačního cyklu se při fixním protokolu současně aplikují GnRH-ant. V případě flexibilního protokolu se GnRH-ant podávají, až pokud ultrazvukové vyšetření potvrdí velikost folikulů o průměru větším jak 14 mm. GnRH-ant je potřeba podávat jednou za 24 hodin. Stimulace pokračuje do doby, kdy ultrazvukové vyšetření potvrdí velikost folikulů o průměru 17-18 mm. Potom se může aplikovat hCG a naplánovat odběr vajíček (OPU, z angl. ovum pick-up). Doba mezi podáním hCG a poslední aplikací GnRH-ant by neměla překročit 30 hodin [26].



**Obrázek 3** - Časový harmonogram stimulačního protokolu s antagonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny [27]

### Krátký stimulační protokol s agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny

Krátký protokol téměř odpovídá menstruačnímu cyklu ženy a trvá 4 týdny. Druhý nebo třetí den cyklu se zahajuje stimulace vaječníků (Obr. 4). Začíná se podáváním FSH současně s GnRH-a po dobu 10-12 dní. Devátý až dvanáctý den se ultrazvukem kontroluje velikost folikulů. Při dosažení požadované velikosti folikulů (18 mm), se naplánuje aplikace hCG. V den, kdy je aplikován hCG se přestává ženě podávat FSH. Odběr folikulů pro IVF se provádí po uplynutí doby 36 hodin po podání hCG. Ideálně by měly být zapojeny oba vaječníky. Krátký protokol se obvykle používá u žen s nižší ovariální rezervou [25, 26, 28].

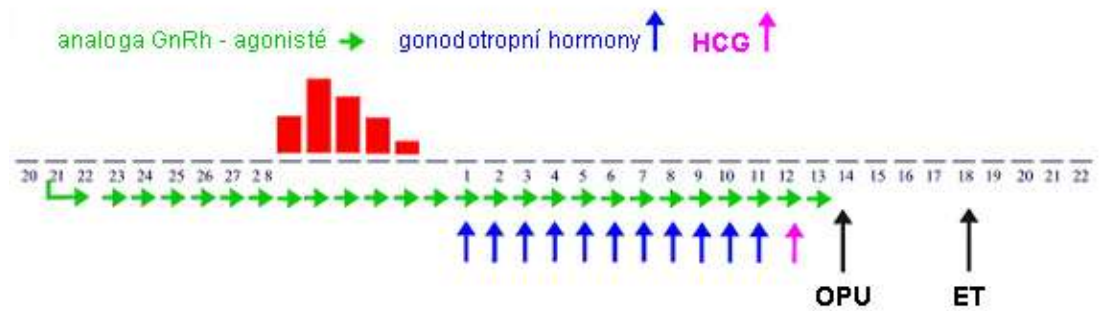


**Obrázek 4** - Časový harmonogram krátkého stimulačního protokolu s agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny [27]

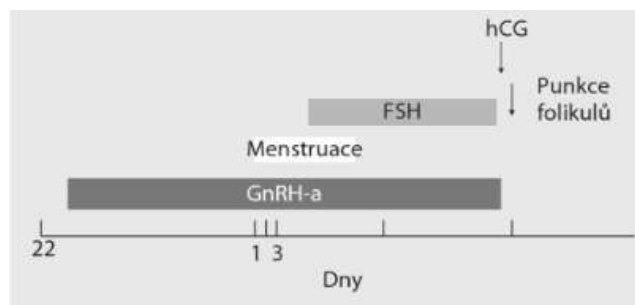
### Dlouhý stimulační protokol s agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny

Tento protokol (Obr. 5) má dvě možnosti zahájení, a to buď z folikulární, nebo luteální fáze menstruačního cyklu. Dlouhý luteální protokol se zahajuje aplikací GnRH-a mezi 22. - 24. dnem menstruačního cyklu (Obr. 6). V následujících 5 až 6 dnech se provádí ultrazvukové vyšetření k vyloučení folikulárních cyst, také se ověřuje, zda je endometrium dostatečně nízké. Při potvrzení dostatečně nízkého endometria se zahájí aplikace FSH, kdy se 8. den po

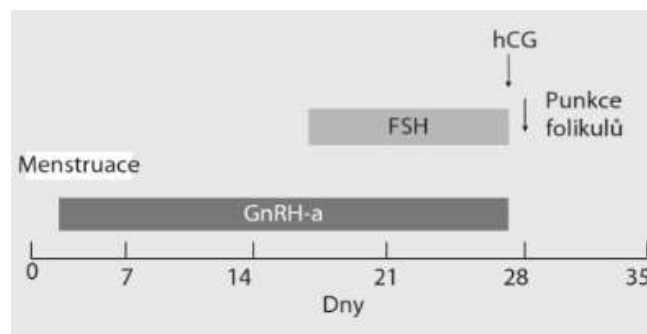
jeho podání provede ultrazvukové vyšetření ovarií. Pokud ultrazvuk potvrdí velikost folikulů pod 12 mm, naplánuje se další vyšetření za dva dny. Při potvrzení větších folikulů se určí termín pro indukční dávku hCG a to na dobu, kdy dominantní folikul dosáhne 18 mm. Dlouhý folikulární protokol je zahájen první nebo druhý den menstruačního krvácení (Obr. 7), a to podáním GnRH-a nebo sprejem do nosu Synarel. Další kroky jsou stejné jako u luteálního protokolu [23, 25, 26].



**Obrázek 5** - Časový harmonogram dlouhého stimulačního protokolu s agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny [27]



**Obrázek 6** - Časový harmonogram dlouhého protokolu započatého z luteální fáze [26]



**Obrázek 7** - Časový harmonogram dlouhého protokolu započatého z folikulární fáze [26]

Je důležité zastavit cykly, pokud existuje riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS). Dlouhý protokol s GnRH-a nepochybně nabízí výhodu získání vyššího počtu kvalitních vajíček, což zvyšuje pravděpodobnost těhotenství, ale jednou z podmínek musí být přiměřená rezerva vajíček [28, 29].

### 3.1.1 Léky pro zvýšení počtu zralých vajíček stimulací růstu folikulů

Princip působení všech medikamentů, které se používají k stimulaci růstu folikulů je zvýšit jejich množství působením FSH [25].

**Antiestrogeny** (klomifen, tamoxifen) jsou deriváty stilbenu. Kompetitivně se váží na receptory estrogenů v hypotalamu a hypofýze, aniž by měly negativní zpětnovazebný účinek. Díky tomu se zvyšuje hladina FSH v krvi. Antiestrogeny se podávají zpravidla na začátku cyklu, většinou po dobu 5 dnů. Mezi výhody této léčby patří minimální riziko hyperstimulace, nízké náklady a možnost perorálního podání. Léčba vede většinou k vývoji 1-3 folikulů. Pro IVF je počet získaných folikulů nedostačující, nicméně se v asistované reprodukci používají při tzv. minimální stimulaci [25, 30].

**FSH** je hormon produkovaný předním lalokem hypofýzy a řadí se mezi gonadotropiny. Vyvolává růst folikulů ve vaječnicích a stimuluje jejich vývoj. Spolu s LH hraje zásadní úlohu v řízení normální funkce ženského reprodukčního systému. U žen se FSH a LH vzájemně doplňují při kontrole gonadálních funkcí, indukují ovulaci a přispívají k rozvoji žlutého tělíska. Produkce FSH v adenohipofýze je stimulována GnRH z hypotalamu a inhibována estradiolem negativní zpětnou vazbou. GnRH stimuluje produkci FSH v adenohipofýze, jen pokud jeho sekrece probíhá v pulzech. Kontinuálně zvýšená hladina GnRH naopak produkci FSH po počátečním vzestupu jeho hladiny blokuje. Lékaři obvykle volí počáteční dávku FSH podle anamnézy a klinických kritérií, z nichž nejdůležitější je výsledek předchozích cyklů IVF. Pokud nebyly provedeny žádné předchozí cykly, bude volba založena na kritériích, jako je věk ženy, BMI a ukazatelé ovariální rezervy [31-33].

**Menotropin**, neboli lidský menopauzální gonadotropin (hMG), je hormonálně aktivní lék (směs FSH a LH v poměru 1:1), jehož podáním dochází k ovulaci při nedostatečném množství endogenního LH. Indukuje růst a vývoj folikulů ve vaječnicích a produkci pohlavních steroidních hormonů. Menotropin se podává injekčně subkutánně nebo intramuskulárně [34, 35].

### 3.1.2 Léky pro zvýšení kvality vajíček

#### Agonisté a antagonisté gonadotropin uvolňujících hormonů

Při řízené hyperstimulaci je nežádoucí, aby současně s podáváním gonadotropinů tyto látky vznikaly i běžnou cestou v těle ženy. Jen velmi obtížně by se dalo sladit jejich společné působení. Proto se ve stimulačních protokolech používají léky, které přirozené uvolňování gonadotropinů v hypofýze blokují. Nazývají se GnRH analoga. GnRH je dekaeptid uvolňovaný v hypotalamu, který svým působením pulzně stimuluje sekreci FSH a LH z předního laloku hypofýzy. Analogy GnRH jsou syntetické hormony vzniklé úpravou molekuly přirozeného hormonu. V léčebných protokolech u IVF cyklů se můžeme setkat se dvěma druhy GnRH analogů, agonisty a antagonisty. Agonisté i antagonisté jsou při perorálním podání neúčinní, proto se všechny gonadotropní stimulační léky aplikují tenkou jehličkou subkutánně [36-39].

#### **Agonisté**

Leuprolidacetát, nafarelinacetát a goserelinacetát jsou agonisté GnRH. Na začátku stimulovaného cyklu způsobí nejprve masivní vyplavení FSH a LH z hypofýzy (tzv. fenomén vzplanutí, „flare-up“) a následně naopak zcela utlumí sekreci gonadotropinů („down“ regulace). Agonisty je proto třeba podávat dlouhodobě, aby se uplatnil jejich blokační účinek [36, 38, 40].

#### **Antagonisté**

Antagonisté přímo blokují GnRH receptory v hypofýze. Následkem podání antagonistů je rychlý pokles hladiny LH v krvi, ke kterému dochází těsně před ovulací. Podání léku tak poskytuje čas pro růst co největšího počtu folikulů před ovulací. Jejich účinek je okamžitý a výraznější než při použití GnRH agonistů [37, 40, 41].

### 3.1.3 Léky k indukci ovulace

Ovulaci fyziologicky spouští tzv. „pík“ LH neboli zvýšená hladina LH. Léky pro indukci ovulace mají za cíl stimulovat uvolňování LH adenohipofýzou. Ovulace nastává za 38-40 hodin po píku LH nebo podání hCG [25, 42].

**hCG** je produkován pouze v těhotenství, a to trofoblastem a později placentou. Průkaz tohoto hormonu v krvi nebo moči se využívá při těhotenském testu. Pro svou strukturální podobnost s LH se používá k tzv. „spuštění“ ovulace. K ovulaci obvykle dojde asi 36 hodin po podání hCG. Interval mezi aktivací hCG a získávání vajíček je velmi důležitý, protože v tomto intervalu je dosaženo řady rozhodujících procesů, jako je začátek luteinizace, expanze buněk kumulu a obnovení meiosis vajíček [36, 38, 43].

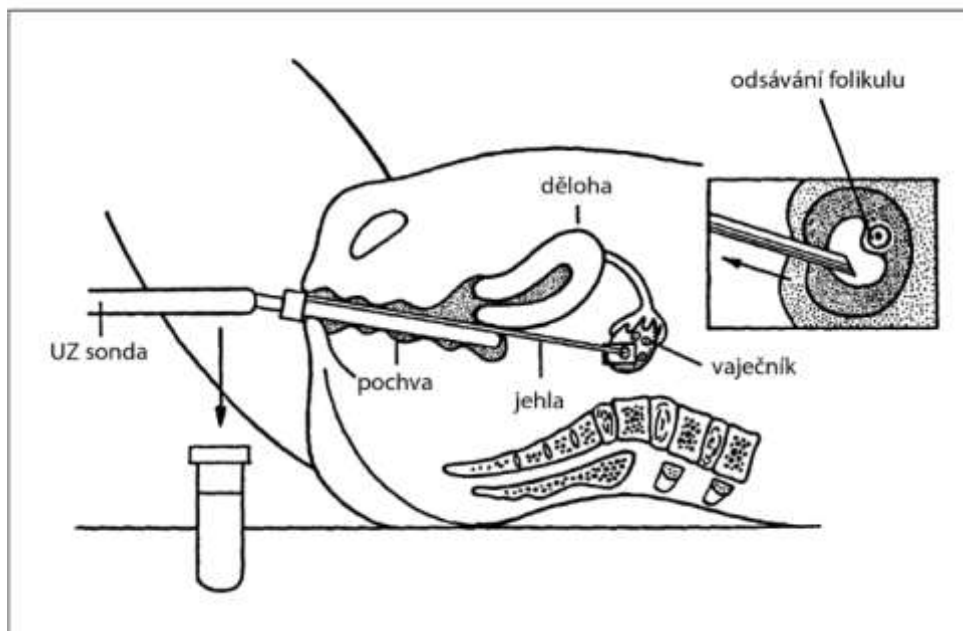
**LH** je produkován adenohipofýzou. U ženy spouští závěrečnou část zrání vajíčka a mechanismus ovulace. Dále vyvolá přeměnu uvolněného folikulu na žluté tělísko a stimuluje produkci progesteronu. Koncentrace LH v krvi je nejspolehlivějším prediktorem ovulace, která je očekávána za 28–36 hodin po začátku vzestupu koncentrace LH nebo 8–20 hodin po odeznění vrcholu hladin LH [26].

## 4 ODBĚR VAJÍČEK A SPERMATU

### 4.1 Odběr vajíček

Samotný proces odběru vajíček je považován za malý operační zákrok, který se provádí 34-36 hodin po aplikaci hCG. Výkon se provádí v krátkodobé narkóze. V klinické praxi asistované reprodukce existují různé termíny k vyjádření odběru vajíček. Mezi nejběžněji používané termíny patří transvaginální punkce folikulů, aspirace folikulů a získávání vajíček [23, 44, 45].

Před punkcí folikulů by mělo být provedeno vaginální a cervikální vyšetření, aby bylo možné zkontrolovat aktuální stav ženy a vyloučit například polypy nebo jiné podmínky, které by mohly narušit plánovaný postup. Transvaginální punkce folikulů (Obr. 8) se provádí ve stejné poloze jako při drobných gynekologických zákrocích. Zevní části genitálu i pochva se očistí fyziologickým roztokem, který na rozdíl od desinfekčních prostředků nemá škodlivý vliv na vajíčka. Na vaginální sondu se navlékne sterilní kondom a připevní se k ní vodič pro punkční jehlu, průměr používané jehly pro tzv. folikulocentézu je 1,2 mm. Při této velikosti je hrot jehly dobře patrný ultrazvukem. Nasává se folikulární tekutina, se kterou se společně odsávají vajíčka. Punkci folikulu je možné také provádět přes kůži na přední stěně břišní. Přístup pochvou je však výhodnější kvůli poloze vaječnicků, které leží velmi blízko klenbě poševní. V mnoha případech na ni i přímo naléhají [26, 45, 46].



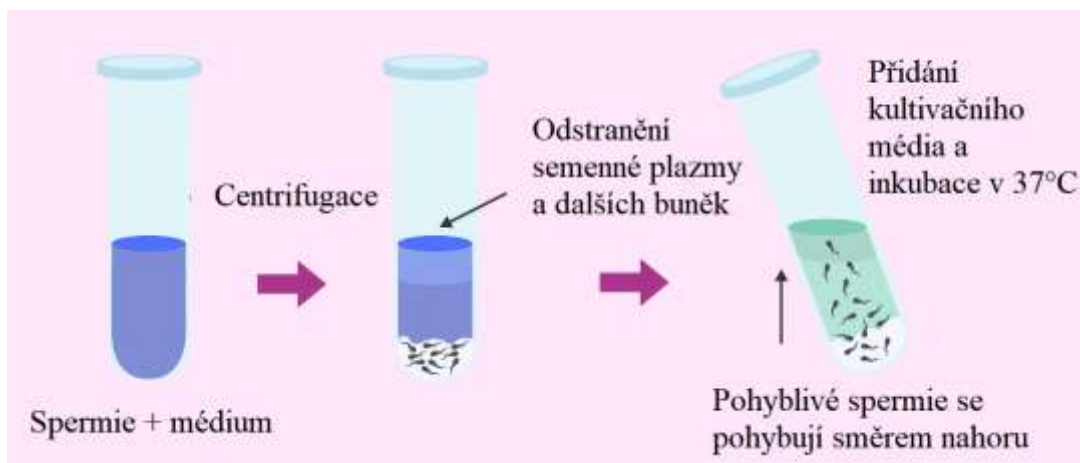
**Obrázek 8** - Punkce folikulů transvaginálně pod kontrolou ultrazvukem [46]



První dvě hodiny po odběru se vajíčka vkládají do kultivačního boxu a inkubují v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby embryolog hodnotí zralost vajíček a zjišťuje přítomnost pólového tělíska. Pro metodu intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI) se vybírají vajíčka s prvním pólovým tělískem, tzn. ty, které se nacházejí v metafázi II. Zbytek vajíček je ponechán v kultivačním boxu 4 až 6 hodin k dozrání. Po zákroku by měl být u ženy sledován její celkový stav, břišní tenze, krevní tlak a srdeční frekvence. Z tohoto důvodu se ženám doporučuje asi 2 hodiny zůstat na lůžku v centru asistované reprodukce. V případě, že žena nemůže produkovat vlastní vajíčka, lze použít vajíčka od dárkyně. Přibližně ve stejnou dobu, kdy se ženě odebírají vajíčka, odevzdává její partner čerstvé, masturbačně získané sperma [23, 45, 47].

## 4.2 Odběr spermatu

Vajíčka mohou být oplodněna čerstvými nebo zmraženými spermii. Odběr spermatu se provádí ejakulací do kelímku v odběrové místnosti, v případě potřeby i za přítomnosti partnerky. Spermie se k oplození *in vitro* musí nejdříve separovat od seminální plazmy. Separace může proběhnout hned několika způsoby. První a zároveň jednodušší postup zahrnuje pouhou centrifugaci ve fyziologickém nebo Ringerově roztoku. Výhodnější metodou k získání kvalitnějších spermií je však tzv. „swim-up“ metoda (Obr. 9). Prvním krokem je odstranění seminální plazmy a dalších buněk centrifugací. Poté se spermie umístí do kultivačního média a vloží do inkubátoru. Vyplaváním získáme populaci živých a dobře se pohybujících spermií, které lze použít k inseminaci nebo ke kryokonzervaci pro budoucí použití. Při zisku jednoho a více miliónů spermií/ml z 1 ml ejakulátu „swim-up“ metodou je pravděpodobnost, že se vajíčka oplodní asi 70%. Při méně než jednom miliónu spermií/ml je to jen kolem 30 %. „Swim-up“ metoda se postupně nahrazuje centrifugací s hustotním gradientem. Vysokou biologickou bezpečnost zaručuje použití komerčně dodávaných roztoků. Výtěžnost spermií o vysoké kvalitě je vyšší než u metody „swim-up“. Po asi 6 hodinách od nasátí vajíček se k nim přidají spermie. Počet oplozených vajíček zjišťuje embryolog přibližně za 17-22 hodin od jejich odběru [23, 48-51].



**Obrázek 9** - Znáornění průběhu metody „swim-up“ [upraveno dle 51]

Někdy jsou vyžadovány i jiné metody k získání spermií. Mikrochirurgickou operací pod optickým zvětšením lze spermie získat metodou mikrochirurgického nasávání spermií z kanálků nadvarlete (MESA), kde dozrávají, nebo metodou extrakce spermií ze vzorku tkáně varlete (TESE), kde se tvoří (Obr. 10). Koncentrace spermií v suspenzi získanou mikrochirurgickým odběrem MESA/TESE je nízká pro následné vyšetření a funkční testy, které by charakterizovaly úspěšnost fertilizace. Po obou výše zmíněných metodách vždy následuje ICSI a je indikováno genetické vyšetření plodu [52-54].

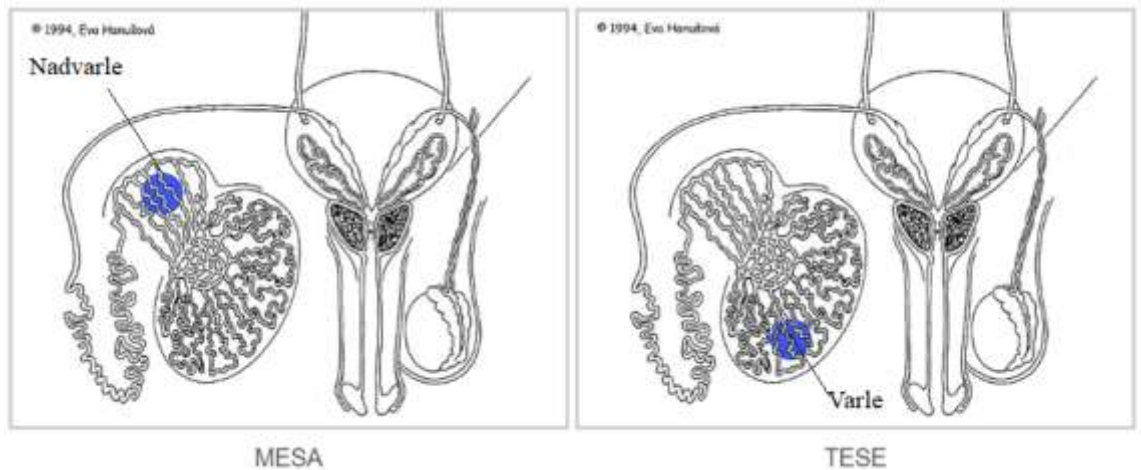
#### **Mikrochirurgické nasávání spermií z kanálků nadvarlete**

Optickým mikroskopem jsou vyhledávány dilatované kanálky nadvarlete, ze kterých jsou punkcí odsáty spermie. MESA se zahajuje přibližně 3cm dlouhým řezem na šourku, který otevírá cestu do nadvarlete. Poté se jehlou odebírá tekutina z kanálků, která je analyzována v embryologické laboratoři ještě před skončením operace. Pro zvýšení výtěžku lze použít jemnou masáž varlat a nadvarlete. Technika MESA zahrnuje řez do kůže, proto existuje riziko infekce a hematomu. Nasávání spermií z nadvarlete je indikována u pacientů, u kterých je porušen transport spermií mezi nadvarletem a močovou trubicí [55-58].

#### **Extrakce spermií ze vzorku tkáně varlete**

Výkon, při kterém se proniká ze skrotální incize k varleti, se provádí vícečetným nářezem *tunica albuginea* k odebrání vzorků tkáně varlete pro zpracování v laboratoři. Varianta zahrnující rozpolcení celého varlete je mikro-TESE, metoda spočívající ve vyhledávání kanálků obsahující spermie mikroskopem. TESE je metoda odběru části kanálků se zachovalou produkcí mužských pohlavních buněk. Spermatogeneze u pacientů s indikací k TESE obvykle probíhá v celé tkáni varlete fokálně a tyto kanálky se navenek prezentují svou dilatací. Odebrané kanálky jsou preparovány v mediu pod mikroskopem a je posouzen

stav spermatogeneze. Odebraná tkáň v sobě obsahuje i nezralá stádia buněk spermatogenetické linie. V případě, že se touto metodou nepovede nalézt spermie, přistupuje se k použití elongovaných a ve výjimečných případech i kulatých spermatid. Chirurgicky získané spermie jsou křehčí než ty ejakulované. Techniky pro zpracování spermií by proto měly být šetrné, aby nedošlo k jejich poškození. Při nenalezení spermií těmito metodami je možno vajíčka oplodňovat spermiemi anonymního dárce [53, 58-60].



**Obrázek 10** - Znárodnění místa odběru spermií při metodě MESA a TESE [upraveno dle 52]

## 5 OPLOZENÍ VAJÍČEK

Dříve se hojně k oplození vajíček používala tzv. konvenční kultivace, která má relativně nízkou úspěšnost. Proto v dnešní době dominuje čím dál více používání mikromanipulačních technik, mezi které patří ICSI a intracytoplazmatická injekce preselektované spermie (PICSI) [61].

### 5.1 Konvenční kultivace

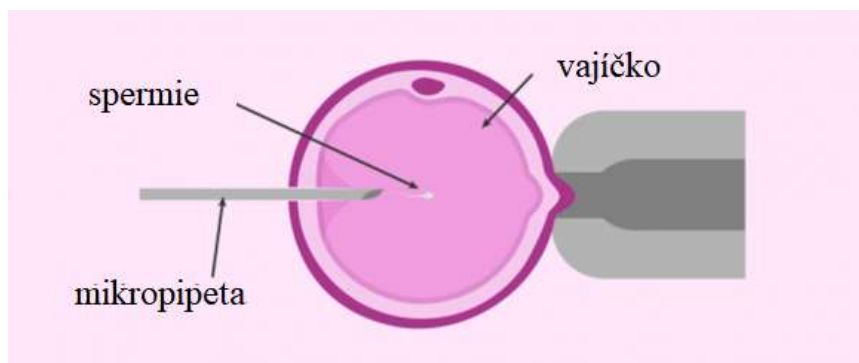
Při konvenčním nebo také klasickém oplodnění se do laboratorní misky, obsahující speciální oplozovací médium, přidá určitá koncentrace spermií s vajíčky a po společné inkubaci se čeká, zda dojde k procesu samovolného oplození. K oplodnění dochází, když jedna ze spermií vstoupí do cytoplazmy vajíčka [64]. U tohoto postupu nemůže embryolog do procesu nikterak zasáhnout. Tato metoda má však relativně nízkou úspěšnost. Lze ji použít jen u mladých párů, kde má muž splněné parametry pro normální spermioqram, žena dostatečný počet kvalitních vajíček a nejsou u nich předpokládány jiné faktory neplodnosti. K dosažení vyšší úspěšnosti je tato metoda nahrazována metodou ICSI a PICSI [62-65].

### 5.2 Intracytoplazmatická injekce spermie

ICSI spočívá v přímé injekci jedné spermie do cytoplazmy zralého vajíčka ženy (Obr. 11). Při jednom klasickém IVF cyklu potřebujeme asi 5 milionů spermií v 1 mililitru spermatu. Pokud použijeme ICSI techniku, stačí nám jich jen tolik, kolik máme k dispozici vajíček [66]. Indikace pro použití ICSI jsou nález patologických hodnot spermioqramu, tedy nízká koncentrace spermií a/nebo vysoký počet abnormálních a pomalu se pohybujících spermií, které mají problém proniknout samy do vajíčka, oplodnění spermii po chirurgické extrakci z varlat, resp. nadvarlat (MESA/TESE), či selhání spontánního oplodnění v předchozím cyklu i v případě normálního spermioqramu [67].

Celý proces se provádí mikromanipulátorem, který mění nedokonalý pohyb rukou na jemný a přesný pohyb prováděný pod mikroskopickou kontrolou. Do tohoto přístroje se připevní držící pipeta (skleněná trubička s kónusem o průměru 0,1 mm), kterou se přidržuje vajíčko. Menší manipulační pipeta (s kónusem o průměru 0,01 mm) nasaje jednu spermii a vpraví ji do vajíčka. Nakonec jsou vajíčka uložena v kultivačních destičkách v inkubátoru. Pokud dojde k oplodnění, tak se vzniklé embryo vyvíjí v laboratoři po dobu 1 až 5 dní, než se přenesou do dělohy. Úspěšnost otěhotnění touto metodou se pohybuje okolo 30 až 35 %. Metodou ICSI se zamezí přirozené selekci spermií, proto je důležité, aby pár podstoupil genetické vyšetření. S poruchou tvorby spermií jsou totiž sdružené chromosomové vady a

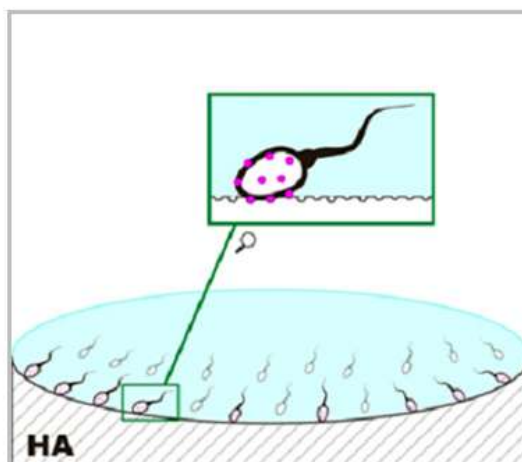
další poruchy, jako je cystická fibróza. Další rizika zahrnují mimoděložní oplození, vícečetné těhotenství, krvácení při odběru vajíček, hyperstimulační syndrom a poodběrovou infekci [64, 66, 68].



**Obrázek 11** - Intracytoplazmatická injekce spermií [68]

### 5.3 Introcytoplazmatická injekce preselektované spermie

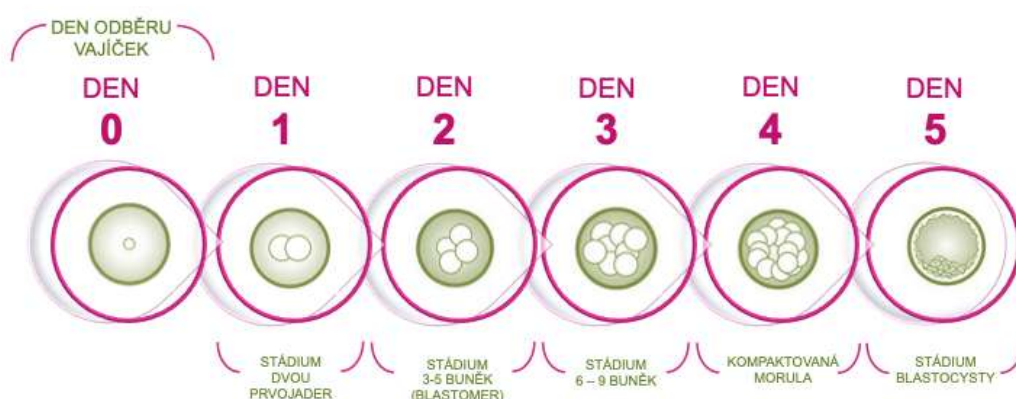
PICSI je modifikovaný postup ICSI. Zatímco při metodě ICSI se spermie vybírají na základě vzhledu a pohyblivosti, při metodě PICSI se volí na základě jejich schopnosti navázat se k hydrogelu kyseliny hyaluronové (Obr. 12). Hyaluronan je mukopolysacharid, který se přirozeně vyskytuje jako součást mezibuněčné hmoty obklopující spolu s kumulárními buňkami vajíčko. Hlavička zralé spermie nese specifický receptor, který jí umožňuje vázat se na hyaluronan, na rozdíl od nezralé spermie, která není této vazby schopna. Spermie, které jsou schopny vazby k hyaluronanu, mají lepší morfologii, statisticky nižší podíl chromosomálních anomálií a lepší integritu DNA. Metoda PICSI je vhodná v případě špatné kvality embryí, teratospermie (patologické hodnoty morfologie spermií) a opakovaného potratu [69,70].



**Obrázek 12** - Zralá spermie se váže na hyaluronan [71]

## 6 KULTIVACE EMBRYÍ

Výběr nejlepšího embrya a jeho přenos do dělohy ženy, neboli embryotransfer je klíčovým krokem v IVF cyklech. Před dosažením tohoto bodu prochází vybraná embrya řadou procesů, které by mohly ohrozit jejich následný vývoj a životaschopnost. Jedním z nejdiskutovanějších faktorů jsou dny strávené v prostředí kultivačních médií. Po klasické kultivaci se zavádějí do dělohy embrya ve stadiu 2 až 4 buněk, tj. po 48 hodinách od oplození vajíček. Po této době ale není ještě možné vybrat ta nejkvalitnější embrya, vhodná pro transfer a oddělit tak embrya s omezenou schopností se dále vyvíjet. Někdy je proto užitečné pokračovat v kultivaci 4-5 dní (Obr. 13), až do fáze blastocysty. Od třetího dne po oplodnění se běžně mluví o tzv. prodloužené kultivaci. V průběhu prodloužené kultivace je také možné provést preimplantační genetické testování (PGT) na buňce nebo shluku buněk získaných z embrya biopsií v 3. nebo 5. den jejich vývoje po oplození [72-74].



Obrázek 13 - Prodloužená kultivace trvající pět dní [75]

### 6.1 Vlastní kultivace embryí

Vlastní kultivace embryí se provádí v živných médiích v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře s 6 % CO<sub>2</sub>. Kultivační média jsou vytvořena komerčně se specifickým složením pro jednotlivé typy reprodukčních buněk a pro rozdílná stadia embryí. V těchto kultivačních médiích tvoří základ hydrogenuhlíčitánový pufr, nutný pro správný metabolismus pohlavních buněk. Krátkodobé udržení optimálního pH je zajištěno N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonovou kyselinou (HEPES). Mezi ostatní složky kultivačního média patří anorganické ionty, především ionty Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>. Embrya nejsou schopna do třetího dne kultivace metabolizovat glukózu, proto jsou součástí kultivačního média jiné látky sloužící jako energetický zdroj (pyruvát, laktát), dále pak také L-aminokyseliny, nukleotidy, fosfátový aniont, albumin, růstové faktory, vitamíny, koenzymy, antibiotika a další pomocné

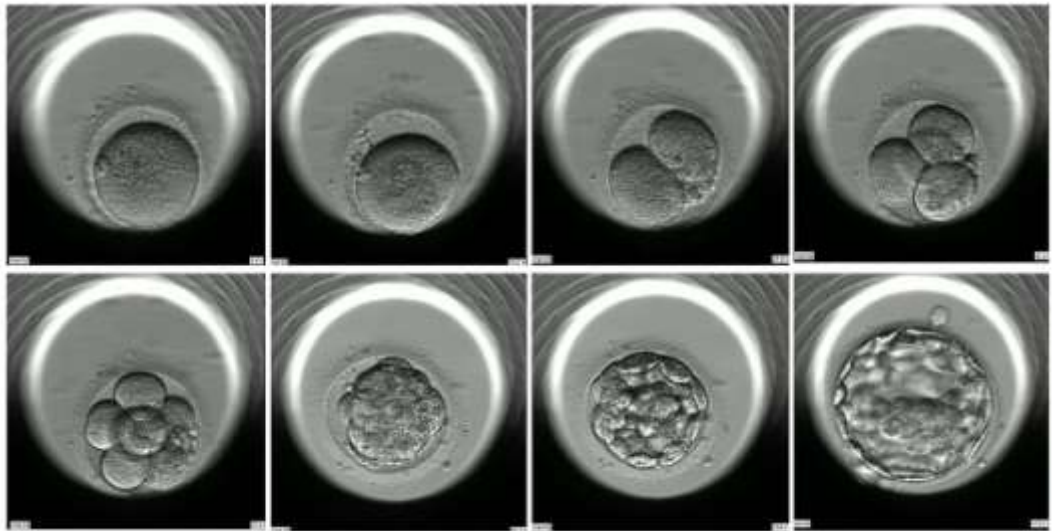
látky. Manipulace s lidskými reprodukčními buňkami probíhá v laminárních boxech s vyhřívanými plochami, a to za dodržování přísně sterilních podmínek. Veškeré další metodiky probíhající mimo inkubátor (např. kontrola embryí pod mikroskopem) musí být provedeny ve velmi krátkém čase, aby nedocházelo k poklesu teploty a změně pH. Při delších manipulacích, například při ICSI, se kultivační médium překrývá vrstvou minerálního oleje, který napomáhá udržet teplotu a pH médií mimo inkubátor [76].

## 6.2 Selektce embryí pro embryotransfer

Výběr embryí s nejvyšším vývojovým potenciálem je založen na základě subjektivního posouzení určitých morfologických znaků charakteristických pro jednotlivá stadia vývoje. Současné hodnocení embryí je plně závislé na zkušenostech embryologa, který mikroskopicky v předem určených časových úsecích vyšetřuje jednotlivá embrya. Hodnocen bývá stupeň fragmentace, přítomnost, počet a velikost jader, počet a symetričnost blastomer u každého embrya [76, 77].

K maximálně efektivní selekci vhodných embryí k transferu se používá moderní metoda semikontinuálního monitorování embryí, tzv. „time lapse embryo monitoring“. Kamera umístěná v inkubátoru snímá embrya každých asi 15 minut. Obrazový materiál (Obr. 14) je přenášen do počítače, kde je zobrazován jako film a následně vyhodnocován. Z obrazového materiálu lze určit časové intervaly dělení buněk, pravidelnost dělení či případné abnormality dělení. Hlavní výhodou monitorování embryí s časovým odstupem je nepřetržité a neinvazivní pozorování embryí, aniž by bylo nutné embryo odebrat z optimálních kultivačních podmínek [76, 78-80].

Vývoj časného embrya je zcela specifický, ovlivněný dozríváním vajíčka před a během jeho oplodnění. V průběhu 1. mitózy se formují prvojádra od matky a otce a dochází k jejich syngamii (fúze samčích a samičích gamet za vzniku zygoty). U časného embrya do stádia 8 buněk neprobíhá vlastní transkripce a embryo využívá zdroje pouze z cytoplazmy vajíčka. Transkripce je zahájena až po 3. mitóze, kdy dochází k aktivaci embryonálního genomu. Tomu odpovídají i délky interfází mezi mitózami. Nejdelší interfáze (až 24 h) je po 4. mitóze, kdy probíhá transkripce genů a syntéza embryonálních proteinů. K výběru toho nejvhodnějšího embrya/í k transferu do dělohy je klíčovým kritériem dodržení intervalů mezi děleními (délky interfází) a synchronizace mitóz (pravidelnost dělení buněk). Zbývající kvalitní embrya jsou zamrzena pro budoucí použití [76, 81].



**Obrázek 14** - Vývoj embrya detekovaný „time-lapse“ technologií [82]



## 7 GENETICKÉ VYŠETŘENÍ EMBRYA

Preimplantační genetické testování představuje soubor molekulárně-biologických metod umožňujících popsat genetický stav embrya před jeho implantací do dělohy ženy. Pro rozlišení konkrétních typů testování embryí se PGT dělí na tři podtypy označované jako preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A), preimplantační genetické testování monogenních onemocnění (PGT-M) a preimplantační genetické testování strukturních chromosomových vad (PGT-SR) [83, 84].

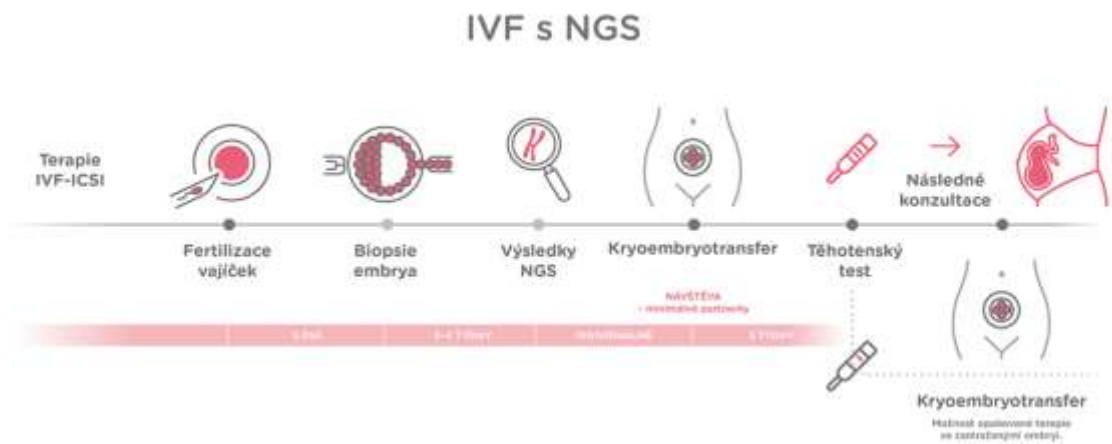
### 7.1 Preimplantační genetické testování aneuploidií

Nesprávné množství chromosomů u transferovaného embrya může být jeden z důvodů jeho nezdařené implantace (zahníždění). Takový stav, kdy se v buňkách vyskytuje abnormální počet chromosomů, ať už vyšší nebo nižší počet, se nazývá aneuploidie. Aneuploidie se může vyskytnout v jakémkoli embryu, pravděpodobnost se však zvyšuje s vyšším věkem matky. V některých případech se aneuploidní embrya mohou vyvíjet až do porodu dítěte (např. Downův syndrom). Většina aneuploidních embryí se však v děloze neimplantuje nebo je těhotenství během prvního trimestru ukončeno spontánním potratem [85-87].

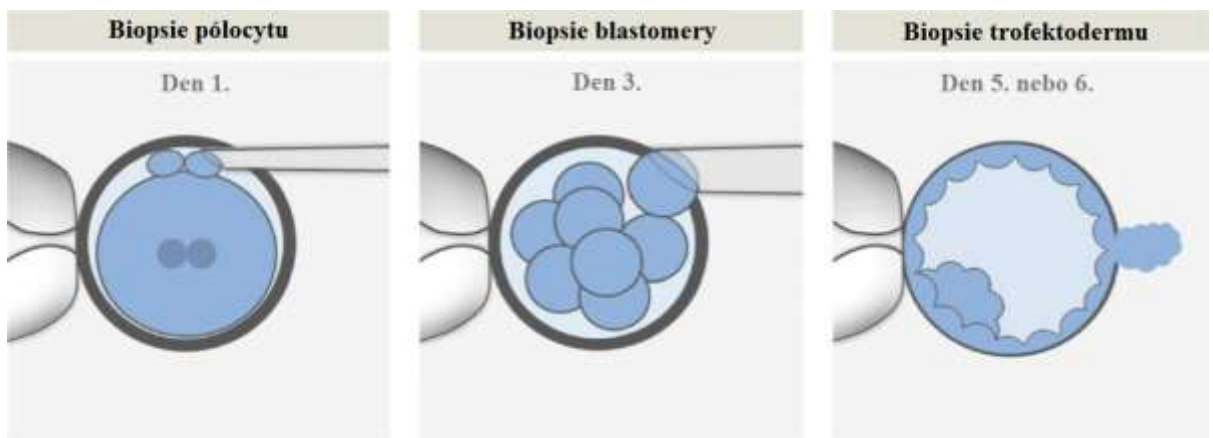
Preimplantační genetické testování aneuploidií, dříve preimplantační genetický screening (PGS) je metoda vyšetřující chromosomální abnormality embrya před jeho transferem do dělohy. Embrya bez chromosomálních abnormalit pak mají nejvyšší šanci na úspěšnou implantaci v děloze a vedou k narození zdravého dítěte. PGT-A je vhodný pro jakýkoli pár podstupující léčbu IVF, převážně je doporučováno v případech jako jsou vyšší věk ženy (>35 let), opakované potraty, opakované neúspěšné embryotransfery v předchozích IVF cyklech, potrat nebo porod plodu s vývojovou vadou (chromosomální abnormalitou), andrologický faktor (těžké poruchy tvorby spermií), prodělaná chemo/radioterapie u jednoho z rodičů, použití spermií po TESE, MESA a genetické vady vázané na pohlaví potomka [85, 86, 88].

PGT-A se provádí metodou sekvenování nové generace (NGS). V praxi (Obr. 15) se 3., 5. nebo 6. den vývoje embrya provede biopsie několika buněk (Obr. 16). Vyšetřovaný materiál zahrnuje buňky embrya (blastomery), trofektoderm a pólocyty, tj. polární tělíska vajíčka. Tímto procesem získáme genetický materiál embrya, z něhož lze určit genetickou výbavu budoucího dítěte. Buňky vzaty z embrya jsou nediferencované, jejich odběr tedy nevede k poškození plodu. V případě, že jsou vyšetřovány buňky embrya se stářím 3 dny, je embryotransfer proveden za dva dny, tj. ve stáří embrya 5 dní). Pokud jsou vyšetřovány

buňky pětidenního embrya, je takové embryo vitrifikováno, tzn. rychle a šetrně zmrazeno a k transferu dochází až v průběhu dalšího cyklu. Výhodou této metody je, že umožňuje rozmražená embrya implantovat do dělohy, která se nachází ve stavu „nejvyšší připravenosti“ k implantaci embrya [85].



**Obrázek 15** - Časová osa metody *in vitro* fertilizace s metodou sekvenování nové generace [83]



**Obrázek 16** - Biopsie embrya [upraveno dle 90]

Pro každé embryo můžeme získat jeden z následujících výsledků:

- **euploidní embryo** – byl nalezen normální počet chromosomů a embryo je doporučeno k embryotransferu;
- **aneuploidní embryo** – embryo má abnormální počet chromosomů. U tohoto případu není embryo doporučeno k embryotransferu;

- **embryo s mozaikou chromosomu** - některé odebrané buňky mají abnormální počet chromosomů, jiné buňky mají normální počet chromosomů. V takovém případě není možné s jistotou posoudit chromosomální výbavu vyšetřovaného embrya a doporučuje se genetická konzultace k vysvětlení všech možných aspektů v případě transferu embrya s mozaikou [86].

## 7.2 Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění

PGT-M, dříve preimplantační genetická diagnostika, je cílená diagnóza určená pro páry, u nichž je prokázáno riziko přenosu závažné genetické choroby, která je podmíněna poruchou jednoho genu. Toto vyšetření se vždy provádí pouze na základě indikace klinického genetika po pečlivém vyhodnocení rodinné anamnézy. K nejčastějším vzácným onemocněním patří cystická fibróza, spinální muskulární atrofie, metabolické poruchy (např. fenylketonurie), dále neurofibromatóza, Marfanův syndrom, syndrom fragilního X chromosomu, Huntingtonova choroba a další. Metoda také umožňuje vyloučit riziko rakoviny prsu nebo vaječnicků. PGT-M je také možné využít v případech, kde se vyskytuje onemocnění, které je možné léčit transplantací kmenových buněk. PGT-M je vybráno embryo, ze kterého může vyrůst jedinec (sourozenec) s kmenovými buňkami vhodnými k transplantaci, tedy geneticky zdravý se stejnou kombinací HLA alel [91-95].

Nejspolehlivější metodou pro PGT-M je „karyomapping“. Metodou „karyomapping“ se vyšetří chromosomy obou rodičů a zároveň i referenčního vzorku na zhruba 300 tisících různých místech. Tím se spolehlivě určí tzv. „DNA profil“ chromosomu s mutovaným genem. Poté se vyšetří všechna embrya tak, aby bylo možné spolehlivě vyloučit ta, která obsahují mutovaný gen. K detekci přenosu konkrétních genetických onemocnění se může použít polymerázová řetězová reakce (PCR). Je to molekulárně biologická metoda, jejímž principem je rychlé a snadné zmnožení vybraného úseku DNA. Hodí se pro všechny známé monogenní genetické choroby. Pokud existují další indikace ze strany lékaře, může se na zdravých embryích dále provádět screening metodou NGS [83, 96, 97].

## 7.3 Preimplantační genetické testování strukturních chromosomových vad

PGT-SR je indikováno pro páry, kde je u jednoho či obou partnerů prokázáno nosičství balancované translokace (při výměně dvou odlomených segmentů dvou chromosomů je zachováno stejné množství genetické informace v buňce) nebo jiné strukturní přestavby chromosomů. Ačkoli většina nosičů balancovaných translokací je zdravých, je u nich vyšší riziko produkce embryí s nesprávným množstvím genetického materiálu, známé jako nebalancovaná forma translokace. Dospělí jedinci často zjistí, že jsou nositelé této vady

pouze tehdy, když mají problémy mít vlastní potomky nebo se u nich objevují potíže v průběhu samotného těhotenství [98, 99].

V současné době se provádí PGT-SR metodou NGS nebo metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). První krok je pro obě metody stejný. Musí se provést biopsie buněk z embrya, které je ve stadiu štěpení (3. den po inseminaci) nebo ve fázi blastocysty (5. - 6. den po inseminaci). Metoda NGS umožňuje zkoumat nebalancované formy translokace většího rozsahu. Předností použití metody NGS je to, že s určením translokace lze současně provést také PGT-A. Metoda FISH naopak zkoumá nebalancované formy translokace v menším rozsahu, ve kterém nelze použít metodu NGS [100, 101].

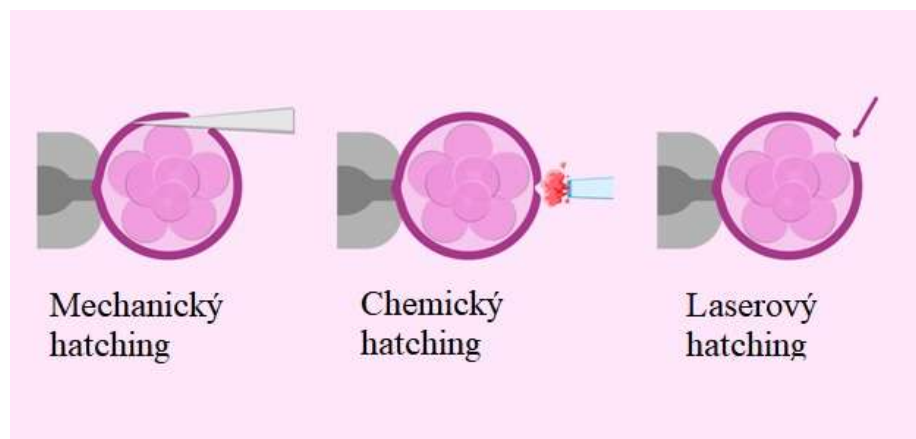
## 8 ASISTOVANÝ HATCHING

Lidské vajíčko a rané embryo je obklopeno glykoproteinovým obalem (*zona pellucida*; ZP), který má především ochrannou funkci. Brání průniku infekce do vajíčka a drží dělící se buňky v kompaktním stavu. V době, kdy vajíčko dorazí do dělohy, musí tento obal opustit a uhnídit se do prokrvené a na těhotenství připravené děložní sliznice. Mnohdy je ale ZP tak silná, že sama prasknout nemůže a buňky tak nemohou opustit ochranný obal. Asistovaný „hatching“ (AH) je mikromanipulační technika, která umožňuje umělé narušení této vrstvy a usnadní embryu přichycení se k děložní stěně. Právě velmi tuhé obaly vajíček mohou být jednou z příčin neplodnosti. Nejvhodnějším obdobím pro provedení AH je 3. den po oplození. Správně vyvíjející se embryo je v tuto dobu šestibuněčné. Pro AH se zvolí maximálně 5 embryí, mikroskopicky vykazující nejlepší morfolologický vývoj. Ženám se před transferem předepisují antibiotika, aby se předešlo infekci, která se snadněji do nechráněného vajíčka zanesou. Technicky se asistovaný „hatching“ provádí několika různými způsoby (Obr. 17), mechanicky, chemicky nebo laserem [102, 103].

**Mechanický „hatching“** se provádí mikromanipulátorem, do kterého se upevní držící pipeta o průměru 0,1 mm. Ta umožňuje přidržovat vajíčko. Menší manipulační pipetou o průměru 0,01 mm se jemně naruší vnější zóna vajíčka. Provedení celého postupu trvá přibližně 5 minut. Je to technika, která se zřídka používá kvůli vysokému riziku poškození embrya.

**Laserový „hatching“** je dnes nejrozšířenější metodou díky její větší bezpečnosti při vytváření otvorů v ZP, protože je zapotřebí jen několik mikropulzů laseru. V prvním kroku se nelaserovým paprskem označí místo, na které následně v druhém kroku směřuje laser. Paprskové okolí je tepelně odstíněno, a proto nedochází k porušení vajíčka vysokými teplotami. Dalšímu možnému poškození embrya se dá předcházet odstraněním všech vibrací v okolí pracovního místa.

**Chemický „hatching“** využívá k rozložení glykoproteinového obalu roztok kyseliny sírové nebo chlorovodíkové. V praxi se často k degradaci ZP používá tzv. Tyrodův roztok, což je roztok obsahující anorganické soli a glukózu. Kapka takového roztoku je schopná vytvořit dostatečný otvor ve vaječném obalu. Embryo je poté důkladně promyto mycími roztoky a nějakou dobu kultivováno, dokud není připraveno na přenos do dělohy. Z důvodu obtížného odhadnutí množství chemických látek se chemické narušení vyznačuje nižší mírou přesnosti [103, 104].



**Obrázek 17** - Způsoby provedení asistovaného „hatchingu“ [upraveno dle 104]

AH je vhodný pro pacientky nad 37 let, protože tvrdost *zona pellucida* roste s věkem ženy, při opakovaném selhání implantace, v rámci metody ICSI, jelikož samotný zásah v podobě vpichu jehly transportující spermii do vajíčka není dostatečný pro usnadnění uhnízdění, pro ženy s vyšší bazální hladinou FSH a při použití zamražených embryí, které někdy mohou mít pevnější obalovou vrstvu. Při AH může často dojít k poranění, zničení nebo defektu embrya. AH je také spojen se zvýšeným rizikem vzniku identických dvojčat, což je zapříčiněno rozdělením embrya mikropipetou na dvě poloviny. V některých případech jsou pozorovány nežádoucí účinky i na matku, a to převážně u žen s hyperovulací. Mezi tyto účinky patří změny nálad, krvácení, infekce a abnormální zvýšení tlaku [103].

## 9 EMBRYOTRANSFER

Závěrečným a nejdůležitějším krokem umělého oplodnění je vložení embrya do dělohy. Embryotransfer (ET) je zákrok, při kterém se jemným katetrem zavede perspektivní embryo přes děložní hrdlo do dělohy (Obr. 18). Embryotransfer se provádí v gynekologické poloze. Výkon je prováděn pod ultrazvukovou kontrolou abdominální sondou. Embrya se přenáší v kapce kultivačního média v množství asi 5 ml. Při zavádění kanyly je optimální vložit její volný konec do vzdálenosti asi 1,5 - 2 cm od fundu děložního a vyhnout se tak případnému poranění endometria a následnému krvácení do dutiny děložní. Krvácení by vedlo k obalení embrya koagulem a zabránilo by úspěšné nidaci embrya. Postup je obvykle bezbolestný, i když u některých žen dochází k mírným křečím. Anestezie často není nutná, přesto lze použít sedativum. Po tomto zákroku pacientka obvykle zůstává v zotavovací místnosti spočívající na zádech a je propuštěna 4-6 hodin po zákroku. Samotná rizika při přenosu embryí jsou pro ženy velmi nízká. Mezi nejčastější komplikace patří krvácení nebo infekce, případně nevolnost spojená s použitím anestezie. Riziko potratu je přibližně stejně velké jako při přirozeném početí [23, 25, 105-109].

V přirozeném cyklu se embryo do děložní dutiny dostává nejdříve 5. den jeho vývoje, tzn. ve stádiu blastocysty. V procesu umělého oplodnění by tomu nemělo být jinak. Nejvhodnější stádium embrya pro transfer je 5. až 6. den od oplození vajíček spermii. V tento den je možné buďto embryo vložit do dělohy, tzv. čerstvý transfer, anebo embrya zamrazit, např. pokud endometrium není připraveno přijmout embrya, a zavést je do dělohy až v následujícím cyklu, tzv. kryoembryotransfer. Transfer embrya později než 6. den od oplození nelze, protože endometrium již není schopno embryo přijmout. Při embryotransferu je vhodné zavádět pouze jedno embryo v nejvyšší kvalitě. Pravděpodobnost otěhotnění se nezvyšuje s vyšším počtem embryí zavedených najednou při jednom transferu, naopak se zvyšuje pravděpodobnost vícečetného těhotenství. Teoreticky je možné, že by pacientka po transferu 2 embryí mohla čekat i čtyřčata. Vícečetná těhotenství bývají často riziková [107].

Přenos jednoho embrya lékaři označují jako elektivní přenos jednoho embrya (eSET), který snižuje pravděpodobnost mnohočetného těhotenství, ale v některých případech je také snížena šance na otěhotnění. Faktory ovlivňující úspěšnost eSET zahrnují věk ženy, kvalitu kultivovaných embryí, počet kultivovaných embryí, počet neúspěšných IVF cyklů v anamnéze a kvalitní program kryokonzervace nadpočetných embryí [110, 111].

Hlavním lékem, který žena nadále po přenosu embryí užívá je progesteron. Jeho doplňkové užívání pomůže nejen podpořit luteální fázi a zvýšit tak šanci na implantaci

vajíčka do dělohy, ale je také nezbytný pro udržení těhotenství. Doba podávání progesteronu je v rozmezí 1-2 týdnů [25, 108].

Embrya se do děložní sliznice implantují obvykle v následujících 24-48 hodinách po embryotransferu. Přibližně 8. den po embryotransferu je produkováno detekovatelné množství hCG v krvi. Hladiny tohoto hormonu se používají pro potvrzení gravidity. Doporučení pro provedení těhotenského testu je minimálně dva týdny po provedení embryotransferu [112, 113].



**Obrázek 18** - Zavedení embrya do dělohy katetrem [upraveno dle 114]

V případě přirozeného cyklu se délka těhotenství nepočítá dle data, kdy došlo k oplození vajíčka, ale vždy od prvního dne poslední menstruace. Tento postup je zachován i u cyklů AR, přestože je přesně známa doba, kdy došlo k oplození [112].



## 10 KRYOKONZERVACE A VITRIFIKACE

Kryokonzervace a vitrifikace jsou techniky využívané k zamrazení biologického materiálu používaného při IVF. Kryokonzervace se volí k uchování spermií. Pro zmrazení vajíček a embryí se využívá technika vitrifikace. Hlavní rozdíl mezi kryokonzervací a vitrifikací je v rychlosti mražení buňky. Během kryokonzervace dochází ke zmrazení buněk rychlostí přibližně 0,3 °C za minutu. U vitrifikace dochází ke skokovému zmrazování, řádově 200 °C/s. Reprodukční buňky se zamrazují na teplotu -196°C [115-118].

Kritickým zlomem v procesu kryokonzervace je zmrazování a zpětné rozmrazování. Při ochlazování roztoku solí nejprve vymrzá čistá voda jako čistý led a až po dosažení eutektika vymrzá tato směs jako celek. Dochází k zvyšování koncentrace solí, mění se osmotický tlak a může dojít také k precipitaci proteinů. Buňce hrozí i mechanické poškození zapříčiněné změnou objemu, který má led větší než voda. Zamezit vzniku poškození buňky lze provedením vitrifikace, jako způsobu zmrazování, při kterém voda tuhne jako podchlazená kapalina ve sklovité formě místo krystalů, přidáním kryoprotektiv, které chrání biologický materiál před účinky nízkých teplot, např. dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, sacharóza, propandiol, proteiny, nebo velmi pomalým zmrazováním (0,005-0,1 °C/s), aby voda mohla vymrznat mimo buňky [118].

Zmrazování se provádí v tenkých trubičkách nazývaných pejety (Obr. 19) s průměrem 1-2 mm a délkou 100 až 120 mm. Jejich malý průměr umožňuje snadný přestup tepla při rozmrazování a zmrazování a jejich tvar je vhodný pro manipulaci, označení a skladování. Pejety se umísťují do kryokontejneru (Obr. 20) naplněného kapalným dusíkem. Použití kapalného dusíku zajišťuje konstantní teplotu pejet, -196 °C. Kapalným dusíkem se musí pravidelně jednou za týden do kryokontejneru doplňovat, protože uvolňování tepla stěnami nádoby vede k jeho odpařování [30].

### 10.1 Kryokonzervace embryí

Kryokonzervace embryí je neoddelitelnou součástí asistované reprodukce a provádí se v ochranném roztoku se sacharózou a propandiolem nebo DMSO. Používá se tehdy, když je k dispozici nadpočet embryí, která nebyla zavedena do dělohy v daném cyklu. Dále v případech vyššího rizika ovariálního hyperstimulačního syndromu či nevhodných podmínkách pro transfer, např. při nízké sliznici děložní, patologickém nálezů na reprodukčních orgánech, apod.. Mrazit lze jen dobře vyvinutá embrya, která jsou zmrazena po 1, 2 eventuálně 3 kusech. Úspěšnost transferu zamrazených a posléze rozmrazených embryí bývá při užití

vitřifikace téměř totožná jako u přenosu čerstvých embryí, a to zejména z toho důvodu, že vitřifikace je již jistý způsob selekce embrya s dostačujícím implantačním potenciálem. V případě, že se ženě nepodaří otěhotnět v cyklu, ve kterém byla embrya zmrazena, nechávají se embrya skladovat 1 rok ode dne zamrazení. Při dosažení těhotenství ukončeného porodem, je délka skladování embryí prodloužena na 2 roky. Po uplynutí této doby je skladování zmražených embryí ukončeno. Hlavní výhoda vitřifikace embryí spočívá v možnosti dalšího embryotransferu bez nutnosti ženy znovu podstupovat hormonální stimulaci vaječnicků a další odběr vajíček [30, 119-121].

## 10.2 Kryokonzervace vajíček

Kryokonzervace vajíček vitřifikací je běžnou součástí léčby neplodnosti. Vitřifikace nabízí zachování plodnosti u žen s rizikem ztráty plodnosti v důsledku onkologického ošetření nebo v případě hrozícího selhávání vaječnicků. Je také vhodná v případě neočekávané absence partnerových spermií v léčebném cyklu IVF. Kryokonzervace vajíček se provádí v ochranném roztoku, jehož hlavními složkami jsou propandiol a sacharóza [30, 122, 123].

## 10.3 Kryokonzervace spermií

Kryokonzervace spermií se provádí v roztoku s obsahem glycerolu a je indikována pro účely darování buněk, před onkologickou či cytostatickou léčbou, pro účely pozdějšího použití a v případě, že hrozí riziko snížení kvality nebo počtu zárodečných buněk. Kvalita kryokonzervovaných spermií je plně srovnatelná s kvalitou spermií čerstvých. Je nutné, aby muž žádající zamrazení spermatu měl v den odběru spermatu výsledky serologických vyšetření. Provádí se vyšetření na HIV, hepatitidu B a C a syfilis [120, 124, 125].



Obrázek 19 - Kryopejeta [30]



**Obrázek 20** - Uložení pejet v kryokontejneru s kapalným dusíkem [30, 126]

## 11 RIZIKA IN VITRO FERTILIZACE

IVF se považuje za poměrně bezpečnou metodou asistované reprodukce. Pokud těhotenství po IVF vede k narození živého dítěte, které je schopné přežít mimo tělo matky, proběhl IVF cyklus úspěšně. V některých případech však může být léčba doprovázena nežádoucími účinky a riziky. Mezi nejčastější komplikace spojené s IVF patří samotné selhání léčby, problémy v důsledku stimulace vaječníků, mnohočetné těhotenství, rizika spojená s odběrem vajíček a mimoděložní těhotenství.

### 11.1 Selhání léčby

Za hlavní důvod neúspěchu při léčbě neplodnosti IVF se považuje špatná kvalita embryí. Mnoho embryí není schopno se po přenosu do dělohy implantovat, protože jsou nějakým způsobem vadná. Dokonce i embrya, která jsou pozitivně hodnocena v laboratoři a doporučena pro transfer mohou mít vady, které zapříčiní jejich zánik místo předpokládaného růstu [127].

### 11.2 Ovariální hyperstimulační syndrom

Léky používané pro stimulaci vaječníků mají u některých žen mírné vedlejší účinky, včetně otoku a bolesti v místě vpichu, bolesti hlavy, žaludeční nevolnost a výkyvy nálad. Nadměrná reakce na užívání léků, při aplikaci injekce s gonadotropiny používaných k růstu vajíček, je ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS). Ženy s OHSS mají velké množství rostoucích folikulů spolu s vysokou hladinou estradiolu. To vede k úniku tekutiny do břicha, což může způsobit nadýmání, nevolnost a otoky břicha. Syndrom má široké spektrum klinických projevů, od mírného onemocnění vyžadující pouze pečlivé pozorování až po závažné onemocnění vyžadující hospitalizaci a intenzivní péči. OHSS lze klasifikovat jako mírné, střední nebo závažné. Ve všech případech OHSS jsou zvětšeny vaječníky. Pokud jsou přítomny symptomy, může být provedena ultrazvuková kontrola k měření velikosti vaječníků a množství nahromaděné tekutiny (Obr. 21). Standardní gynekologické vyšetření není obecně doporučováno, protože vaječníky jsou zvětšené a přítomné ovariální cysty by mohly pod tlakem prasknout. Riziko OHSS může být sníženo použitím nižších dávek gonadotropinů. Ženám se mohou podávat léky na nevolnost. Pokud je stav akutní a v břiše se nachází tekutina, je nejrychlejším řešením paracentéza, to znamená vypuštění tekutiny z břicha vpichem vedeném přes břišní stěnu [128].



**Obrázek 21** - Hyperstimulovaný vaječník po terapii gonadotropiny [129]

### **11.3 Komplikace při odběru vajíček**

Ve vzácných případech může dojít při odběru vajíček k nadměrnému krvácení z vaječnicků nebo poškození orgánů v blízkosti vaječnicků, jako je močový měchýř, střeva nebo krevní cévy. Pokud je poranění závažné, může být zapotřebí krevní transfúze nebo chirurgický zákrok k nápravě poškození. Dalším rizikem je pánevní infekce. Opět je to velmi vzácné, ale u žen, které dříve podstoupily pánevní infekce, je riziko této komplikace větší [130].

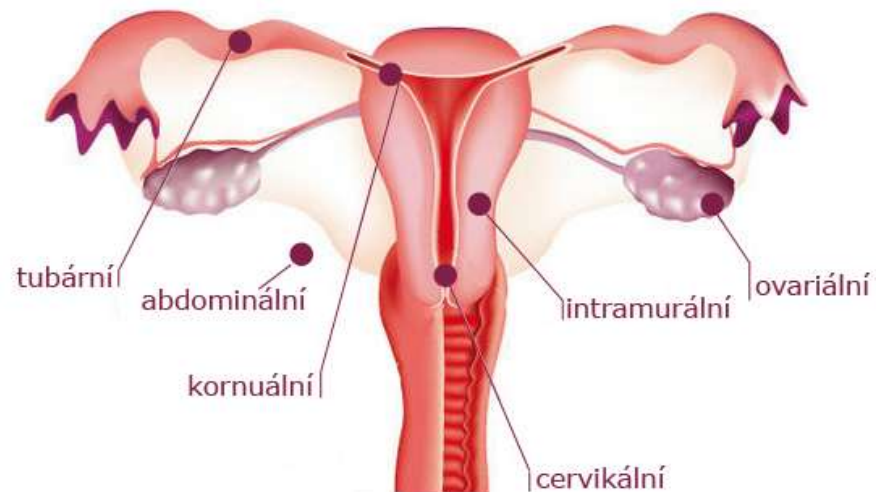
### **11.4 Vícečetné těhotenství**

Mnohočetné těhotenství je častou komplikací IVF programu, pokud se do dělohy zavádí více než jedno embryo. Přestože se dá do značné míry předcházet tomuto stavu přenosem pouze jednoho embrya, počet vícečetných těhotenství po IVF zůstává vysoký. Takové těhotenství není pro ženu přirozené a je provázeno větším množstvím komplikací, které mohou postihnout jak matku, tak plod. Komplikace vedou ke graviditě s rizikem předčasného porodu, rozvoji těhotenské cukrovky či zvýšenému krevnímu tlaku [131].

### **11.5 Mimoděložní těhotenství**

Mimoděložní těhotenství je hlavní příčinou mateřské morbidity a mortality během prvního trimestru a incidence se dramaticky zvyšuje technologií asistované reprodukce. Mimoděložní těhotenství se vyskytuje přibližně u 1,5–2,1% pacientek podstupujících oplodnění IVF. Ačkoli je embryo během ET umístěno do dělohy (obvykle 1,8 cm od

vrcholu), děložní kontrakce mohou embryo pohánět dále skrz vejcovody. To znamená, že se embryo může před implantací ještě 12-24 hodin pohybovat. Většina mimoděložních těhotenství je ve vejcovodech, ale k implantaci může dojít i na jiných místech, jako je děložní čípek, vaječník nebo břicho (Obr. 22). Mezi navrhované rizikové faktory mimoděložního těhotenství patří neplodnost způsobená tubulárním faktorem (neprůchodností nebo absencí vejcovodů), endometrióza, předchozí mimoděložní těhotenství, vyšší počet přenesených embryí nebo snížená tloušťka endometria. Plod má mimo dělohu extrémně nepříznivé podmínky pro svůj další vývoj a neřešené mimoděložní těhotenství má vysoké riziko úmrtí matky. Kvůli prakticky nulové pravděpodobnosti záchrany plodu se přistupuje k ukončení těhotenství. Plodnost po mimoděložním těhotenství závisí na několika faktorech, z nichž nejdůležitější je předchozí anamnéza neplodnosti [132-134].



**Obrázek 22** - Typy mimoděložního těhotenství podle místa uhníždění oplozeného vajíčka [135]

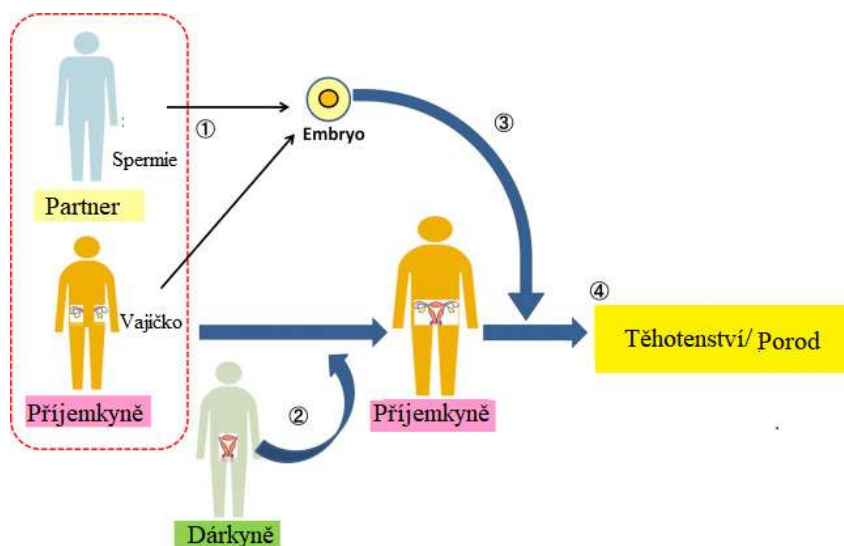
## 12 BUDOUCNOST IN VITRO FERTILIZACE

Metoda IVF je celosvětově hojně využívána v léčbě neplodnosti, proto existuje obrovské úsilí používané techniky neustále vylepšovat. Každá alternativa přirozené reprodukce však vedle nadšení z přelomového objevu generuje i řadu etických otázek.

### 12.1 Transplantace dělohy

Transplantace dělohy představuje novou experimentální metodu léčby ženské neplodnosti. Jsou k ní indikovány ženy s děložním faktorem neplodnosti, mezi které patří hlavně absence dělohy nebo z pohledu těhotenství její nefunkčnost. Transplantace dělohy, na rozdíl od jakékoli jiné transplantace orgánů, zahrnuje nejméně čtyři strany, příjemce, dárce, partner příjemce a možné budoucí dítě (Obr. 23). Pokud je nutné provést chirurgický zákrok, jsou všichni vystaveni potenciálním rizikům. Jedná se o složitou proceduru, která má nejen lékařské, ale také psychologické dopady. Ženy po transplantaci dělohy nemohou otěhotnět pohlavním stykem, ale musí podstoupit IVF. Transplantace dělohy vyžaduje, aby ženy užívaly léky, které by zabránily odmítnout nový orgán, což může mít vážné vedlejší účinky, včetně účinků na plod [136-138].

První transplantaci dělohy v České republice uskutečnili lékaři z IKEM 30. dubna 2016. Pacientkou byla třicetiletá žena s vrozenou vadou, která jí neumožňovala mít dítě, a dárkyní její třiapadesátiletá matka. Ve světě se transplantují dělohy i od mrtvých dárkyň. V prosinci 2017 se po takovém zákroku narodilo v Brazílii pacientce živé dítě [139].



**Obrázek 23** - Schéma znázorňující zúčastněné strany při transplantaci dělohy [upraveno dle 140]

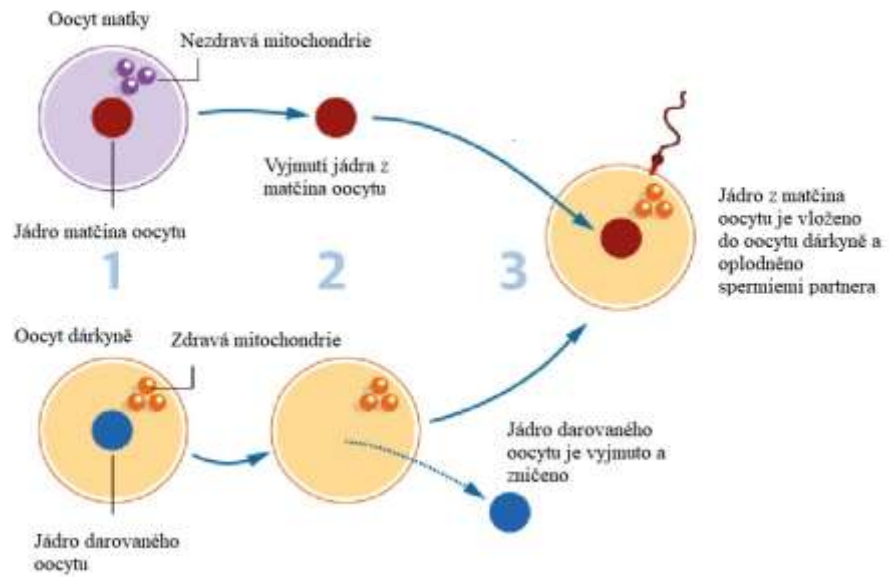
## 12.2 „Designer babies“

Ve své nejjednodušší definici je „designer babies“ embryo, které bylo geneticky modifikováno nebo genově upraveno kvůli početí dítěte se specifickými vlastnostmi. V některých případech mohou být odstraněny nepříznivé vlastnosti, jako je genetické onemocnění nebo mohou být naopak přidány pozitivní vlastnosti, jako je zvýšená inteligence a síla. Existuje však mnoho etických otázek týkajících se genetických modifikací a jejich účelů. Vědci vidí potenciál nejen v optimalizaci genů pro prevenci nemocí, ale také možnost si vybrat estetické a osobnostní rysy budoucího dítěte. Na tvorbě geneticky modifikovaného (GM) dítěte se podílejí různé technologie. Jeden z protokolů zahrnuje preimplantační genetickou diagnostiku, po které se zavádí do dělohy embrya postrádající genetické poruchy. Poslední novinkou je technologie CRISPR, známá jako CRISPR-CAS9, kdy jsou „designer babies“ vytvořeny úpravou fragmentů DNA. CAS9 je speciální technologie, která dokáže odstranit nebo přidat určité typy genů v molekule DNA. Prevence a léčba nemocí má však jinou etickou konotaci než výběr pohlaví dítěte, volba barvy očí či sportovní nadání. Pokroky v léčbě IVF, CRISPR-CAS9 a cílené úpravy genomu umožňují zabránit přenosu genetických poruch a zvýšit tak šance na porod zdravého potomka. To znamená, že v blízké budoucnosti se může stát hlavním nástrojem pro prevenci nemocí a rakoviny, jako je například dědičnost mutace genu BRCA [141].

## 12.3 Mitochondriální substituční terapie

Mitochondrie obsahují genetickou informaci v podobě mitochondriální DNA, která může být mutována. Mutace se mohou přenášet na budoucí generace. Mitochondriálními chorobami jsou zasaženy orgány, které potřebují hodně energie, jako jsou srdce, mozek a svaly. Technika, kterou můžeme zabránit přenosu některých mitochondriálních chorob z matky na dítě a které jsou způsobeny mutacemi mitochondriální DNA, spočívá ve vyjmutí jaderné DNA z matčina vajíčka a její přenesení do vajíčka dárkyně se „zdravými“ mitochondriemi, z něhož bylo předtím odstraněno jádro. Takto upravené vajíčko se oplodní spermií otce a výsledné embryo se vloží do dělohy jako při běžném IVF (Obr. 24). Uvedená technika se označuje jako přenos komplexu chromosomů z vajíčka matky do vajíčka dárkyně (MST, z angl. maternal spindle transfer). Tato metoda umožnila neplodným párům mít své biologické děti, přestože mají svým způsobem tři rodiče [142, 143].





**Obrázek 24** - Schematicky znázorněný postup při substituci mitochondrií [upraveno dle 142]

## ZÁVĚR

Porucha plodnosti je jedním z témat, které odráží podobu současných rodin a ovlivňují párové soužití. Stále přibývá párů, které nemůžou mít děti spontánní koncepcí a potřebují pomoc lékařů. Snaha pořídit si potomka přirozenou cestou bude za několik let natolik složitá, že se nejčastější metodou početí stane umělé oplodnění *in vitro* fertilizace. V současnosti metodu IVF velmi úspěšně doplňují tzv. mikromanipulační techniky, mezi které patří intracytoplazmatická injekce spermie, asistovaný hatching, kryoembryotransfer a extrakce spermií z varlete. Asistovaná reprodukce se neustále vyvíjí a zdokonaluje, zároveň má své zaryté zastánce i odpůrce. Nabízí se otázka, zda skutečně smíme provádět všechno, co provádět dovedeme. Realisticky to směřuje k tomu, že vše, co je technicky možné, je i dovolené. Je také možné předpokládat rozmach eugeniky s tím, že rodiče budou chtít dětem předat jen takové genetické informace, které budou považovat za atraktivní.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SHARMA, RS, R SAXENA a R SINGH. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective [online]. [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_636\_18. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6469376/>
- [2] PROCREA SWISS IVF CENTER. *Vývojová řada embryí* [online]. 2020 [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <https://www.procreaivf.cz/vyvojova-rada-embryi>
- [3] DOW, Katharine. *Looking into the Test Tube: The Birth of IVF on British Television* [online]. [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1017/mdh.2019.6. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025727319000061/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025727319000061/type/journal_article)
- [4] WANG, Jeff a Mark V SAUER. *In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement* [online]. [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.2147/tcrm.2006.2.4.355. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/in-vitro-fertilization-ivf-a-review-of-3-decades-of-clinical-innovatio-peer-reviewed-article-TCRM>
- [5] KAMEL, RM. *Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown* [online]. [cit. 2020-04-23]. PMC3799275. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3799275/>
- [6] BIONEWS. *First baby for mum born of IVF* [online]. 2020 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: [https://www.bionews.org.uk/page\\_87917](https://www.bionews.org.uk/page_87917)
- [7] SANATORIUM HELIOS. *35 let od narození prvního dítěte ze zkumavky* [online]. 2020 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.sanatoriumhelios.cz/35-let-od-narozeni-prvniho-ditete-ze-zkumavky/>
- [8] *NEMOCNÍČNÍ LISTY*. 2017, **18**(4). ISSN 1802-0224. Dostupné také z: <https://www.fnbrno.cz/nemocnicni-listy-4-2017/f3761>
- [9] AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *Intrauterine Insemination (IUI)* [online]. 2020 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: [https://www.reproductivefacts.org/news-and-publications/patient-fact-sheets-and-booklets/documents/fact-sheets-and-info-booklets/intrauterine-insemination-iui/?\\_ga=2.89766299.1073638004.1584359434-1327668512.1584359434](https://www.reproductivefacts.org/news-and-publications/patient-fact-sheets-and-booklets/documents/fact-sheets-and-info-booklets/intrauterine-insemination-iui/?_ga=2.89766299.1073638004.1584359434-1327668512.1584359434)
- [10] NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR WOMEN'S AND CHILDREN'S HEALTH. *Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems*.

2004. ISBN 978-1-4731-0029-9. Dostupné také z: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/evidence/full-guideline-pdf-188539453>
- [11] GENNET .Intrauterinní inseminace (IUI) [online]. 2020 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/intrauterinni-inseminace-iui>
- [12] OMBELET, Willem, Rudi CAMPO, Eugene BOSMANS a Martine NIJS. Intrauterine insemination (IUI) as a first-line treatment in developing countries and methodological aspects that might influence IUI success [online]. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/eshremonographs/article/2008/1/64/620672>
- [13] YAVUZ, Arzu, Oya DEMIRCI, Hamdullah SÖZEN a Mehmet ULUDOĞAN. *Predictive factors influencing pregnancy rates after intrauterine insemination* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3943223/>
- [14] IVF CLINIC – CENTRUM ASISTOVANÉ REPRODUKCE OLOMOUC. *Metody léčby neplodnosti* [online]. 2017 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <http://www.ivfclinic.cz/metody-lecby-neplodnosti.php>
- [15] ALLAHBADIA, Gautam N. *Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited* [online]. [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1007/s13224-017-1060-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13224-017-1060-x>
- [16] FERTICARE PRAGUE. *In vitro fertilizace* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.ferticareprague.eu/cz/ivf/>
- [17] SLÍPKA, Jaroslav a Zbyněk TONAR. *Základy embryologie. 2.*, upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2019, 140 s. ISBN 978-80-246-4179-9.
- [18] AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *In Vitro Fertilization (IVF)* [online]. 2020 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.reproductivefacts.org/topics/topics-index/IVF2/>
- [19] MAYO CLINIC . *In vitro fertilization (IVF)* [online]. 2020 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/in-vitro-fertilization/about/pac-20384716>
- [20] DECHERNEY, A.H. *In vitro fertilization and embryo transfer: a brief overview.* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2590090/>

- [21] REPROGENESIS. *IVF - in vitro fertilizace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <https://www.reprogenesis.cz/lecba-neplodnosti/metody-lecby-neplodnosti/in-vitro-fertilizace/>
- [22] PAPANIKOLAOU, Evangelos G, Efstratios KOLIBIANAKIS a Paul DEVROEY. *Emerging drugs in assisted reproduction* [online]. , 425-440 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1517/14728214.10.2.425. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728214.10.2.425>
- [23] ŘEZÁČOVÁ, Jitka. *Asistovaná reprodukce v léčbě neplodnosti* [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2005-8/?pdf=73>
- [24] FERTILITY CENTRES OF NEW ENGLAND. *IVF Protocols* [online]. 2020 [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: [https://www.fertilitycenter.com/fertility\\_cares\\_blog/ivf-protocols/](https://www.fertilitycenter.com/fertility_cares_blog/ivf-protocols/)
- [25] ŘEŽÁBEK, Karel. *Asistovaná reprodukce. 2., aktualiz. a dopl. vyd.* Praha: Maxdorf, c2014. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-396-1.
- [26] WEISS, Petr. *Sexuologie*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2492-8.
- [27] PROCREA SWISS IVF CENTER. *Stimulační protokoly* [online]. 2020 [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <https://www.procreaivf.cz/stimulacni-protokoly>
- [28] VITTORIAVITA. *Peculiarities of IVF protocols of ovarian stimulation*. [online]. 2020 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://vittoriavita.com/ivf-protocols/#types-of-protocols>
- [29] SHRESTHA, Deekshya, Xiaolin LA a Huai L. FENG. *Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review* [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4486909/>
- [30] ROZTOČIL, Aleš a Pavel BARTOŠ. *Moderní gynekologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2832-2.
- [31] DATOVÝ STANDARD MZ ČR - VERZE 4. *Folitropin* [online]. 2020 [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/BAAAH.htm>
- [32] TRÁVNÍK, Pavel. *Moderní tendence ve stimulaci ovarií* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/04/02.pdf>
- [33] LA MARCA, Antonio, Valentina GRISENDI, Simone GIULINI, Cindy ARGENTO, Alessandra TIRELLI, Giulia DONDI, Enrico PAPALEO a Annibale VOLPE. *Individualization of the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles using the antral follicle count* [online]. [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1186/1757-2215-6-11. Dostupné z: <http://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-2215-6-11>

- [34] DRUGBANK. *Menotropins* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00032>
- [35] SHI, Shaoquan, Ting HONG, Fangfang JIANG, Yuan ZHUANG, Le CHEN a Xiaoling HUANG. *Letrozole and human menopausal gonadotropin for ovulation induction in clomiphene resistance polycystic ovary syndrome patients* [online]. [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1097/MD.00000000000018383. Dostupné z: <http://journals.lww.com/10.1097/MD.00000000000018383>
- [36] GEST. *Léky užívané při léčbě neplodnosti a metodách asistované reprodukce* [online]. 2020 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.gest.cz/leky-uzivane-pri-lecbe-neplodnosti-a-metodach-asistovane-reprodukce>
- [37] URBÁNEK, Štěpán. *Léčebné přípravky v ambulanci pro léčbu neplodnosti* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Gynekologie-a-porodnictvi/Lecebne-pripravky-v-ambulanci-pro-lecibu-neplodnosti/8-14-iv.magarticle.aspx>
- [38] AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *Medications for Inducing Ovulation* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: [https://www.reproductivefacts.org/globalassets/rf/news-and-publications/bookletsfact-sheets/english-fact-sheets-and-info-booklets/booklet\\_medications\\_for\\_inducing\\_ovulation.pdf](https://www.reproductivefacts.org/globalassets/rf/news-and-publications/bookletsfact-sheets/english-fact-sheets-and-info-booklets/booklet_medications_for_inducing_ovulation.pdf)
- [39] HARBULÁK, Peter. *Podpora luteálnej fázy v cykloch asistovanej reprodukcie* [online]. GYN-FIV, A.S., BRATISLAVA. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.edukafarm.sk/data/soubory/BROZURA/PROGESTERON/Podpora.pdf>
- [40] BODRI, D., V. VERNAEVE, J.J. GUILLÉN, R. VIDAL, F. FIGUERAS a O. COLL. *Comparison between a GnRH antagonist and a GnRH agonist flare-up protocol in oocyte donors: a randomized clinical trial* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/humrep/article/21/9/2246/2938859>
- [41] PROGYNY. *The Types and Uses of Fertility Drugs* [online]. 2020 [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://progyny.com/education/fertility-medication/fertility-drugs/>
- [42] INFOCLINIC. *LH peak* [online]. 2019 [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://inofolic.cz/slovník/lh-peak/>
- [43] MAN, Limor, Joel BARON, Iris HAR-VARDI, Eitan LUNENFELD a Eliahu LEVITAS. *A Live Birth Subsequent to IVF following Egg Retrieval Only 12 Hours after hCG Priming* [online]. [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1155/2013/634385. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/criog/2013/634385/>

- [44] ROKYTA, Richard. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
- [45] ESHRE Working Group. *Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up* [online]. [cit. 2020-05-21]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/hropen/article/2019/4/hoz025/5625062?searchresult=1>
- [46] ŘEŽÁBEK, Karel. *Léčba neplodnosti: 4., aktualizované vydání*. ISBN 978-80-247-2403-3.
- [47] NOUNIHAR, MSA a SL ALI. *Assisted Reproductive Technology (ART) is a solution for Infertility*. [online]. [cit. 2020-06-04]. Dostupné z: <https://poliklinika-harni.hr/images/uploads/187/tehnike-asistirane-reprodukcije.pdf>
- [48] GENNET. *In vitro fertilizace (IVF)* [online]. 2020 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/in-vitro-fertilizace-ivf>
- [49] NHS. *What happens - IVF*. [online]. 2019 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/ivf/what-happens/>
- [50] ZDRAVOTNICTVÍ A MEDICÁNA. *Spermie v IVF laboratoři – několik postřehů z rutinní praxe*. [online]. 2020 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/spermie-v-ivf-laboratori-nekolik-postrehu-z-rutinni-praxe-160336>
- [51] INVITRA. *Sperm capacitation by swim-up* [online]. 2020 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.invitra.com/en/sperm-capacitation/sperm-capacitation-by-swim-up/>
- [52] ANDROMEDA. *Mužská neplodnost* [online]. 2020 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://andromeda.cz/muzska-neplodnost/>
- [53] MARDEŠIĆ, Tonko. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. 2013. ISBN 978-80-247-4458-2.
- [54] SLEZÁKOVÁ, Lenka. *Ošetřovatelství v gynekologii a porodnictví: 2., přepracované a doplněné vydání*. ISBN 978-80-271-9794-1.
- [55] HANUŠ, Tomáš a Petr MACEK. *Urologie pro mediky*. 2015. ISBN 978-80-246-3008-3.
- [56] GENNET. *Průvodce léčebnými programy a metodami léčby neplodnost*. [online]. 2018 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/cs/file-link/e-book-cz.pdf>
- [57] VIJ, Sarah Coleman a Edmund SABANEGH. *Sperm Retrieval From the Scrotal Extratesticular Ductal System* [online]. [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383647992?via%3Dihub>

- [58] REPROFIT. *MESA / TESE* [online]. [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.reprofit.cz/umele-oplodneni/mesa-tese/>
- [59] VERZA, Sidney a Sandro ESTEVES. *PESA/MESA/TESA/TESE Sperm Processing* [online]. [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/334208455\\_PESAMESATESATESE\\_Sperm\\_Processing](https://www.researchgate.net/publication/334208455_PESAMESATESATESE_Sperm_Processing)
- [60] SANATORIUM HELIOS. *Odběr oocytů a spermií* [online]. 2020 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.sanatoriumhelios.cz/odber/>
- [61] REPROMEDA. *Embryologické metody* [online]. 2020 [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.repromeda.cz/poskytovana-pece/lecba-neplodnosti/ivf/metody-oplozeni/>
- [62] REPROMEDA. *ICSI a PICSI. Nejúspěšnější embryologické metody zajišťující oplození zralého vajíčka optimální spermií.* [online]. 2020 [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.repromeda.cz/icsi-a-picsi-nejuspesnejsi-embryologicke-metody-zajistujici-oplozeni-zraleho-vajicka-optimalni-spermii/>
- [63] REPROMEDA. *Oplození* [online]. 2020 [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.sanatoriumhelios.cz/oplozeni/>
- [64] AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *What is Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)?* [online]. 2020 [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.reproductivefacts.org/news-and-publications/patient-fact-sheets-and-booklets/documents/fact-sheets-and-info-booklets/what-is-intracytoplasmic-sperm-injection-icsi/>
- [65] SANUS. *Metody léčby - Péče embryologa* [online]. 2020 [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.sanus.cz/sanus-jihlava/metody-lecby-pece-embryologa>
- [66] LÉKAŘI-ONLINE.CZ. *Intracytoplazmatická injekce morfologicky selektované spermie – ICSI* [online]. [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/injekce-spermii-icsi>
- [67] PRAGUE FERTILITY CENTRE. *Intracytoplazmatická injekce spermií* [online]. 2020 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://www.pragueivf.com/cs/knowledge-base/icsi>
- [68] INVITRA. *The ICSI Process – How Does It Work Step by Step?* [online]. 2020 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://www.invitra.com/en/about-the-icsi-process/>
- [69] NATALART S.R.O. *Injekce vybrané spermie do vajíčka - PICSI* [online]. 2020 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: <http://www.natalart.cz/index.php/cs/lecebne-metody/picsi>
- [70] SANATORIUM HELIOS. *PICSI* [online]. [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://www.sanatoriumhelios.cz/picsi/>



- [71] JANINI IVF. *PICSI* [online]. 2019 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://www.janiniivf.com/picci>
- [72] PEÑA, Fernando, Rocío DÁVALOS, Adolfo RECHKEMMER, Alvaro ASCENZO a Mauricio GONZALES. *Embryo development until blastocyst stage with and without renewal of single medium on day 3* [online]. [cit. 2020-06-27]. DOI: 10.5935/1518-0557.20180012. ISSN 1518-0557. Dostupné z: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1518-0557.20180012>
- [73] CENTRUM ASISTOVANÉ REPRODUKCE BRNO. *Embryologické metody* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <http://www.ivfbrno.cz/embryologicke-metody/t1046>
- [74] KARLSBAD FERTILITY. *Prodloužená kultivace embryí* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.ivf-kv.cz/kultivace-embryi/>
- [75] REPROGENESIS. *Prodloužená kultivace embryí* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.reprogenesis.cz/lecba-neplodnosti/metody-lecby-neplodnosti/prodlouzena-kultivace-embryi/>
- [76] ZDRAVOTNICTVÍ A MEDICÍNA. : *Selekce lidských embryí podle délky buněčných cyklů a pravidelnosti dělení* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/selekce-lidskych-embryi-podle-delky-bunecnych-cyklu-a-pravidelnosti-deleni-463809>
- [77] PROLÉKAŘE.CZ. : *Volba nejlepšího embrya – hodnocení morfologie, nebo morfokinetiky?* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/tema/asistovana-reprodukce/detail/volba-nejlepsiho-embrya-hodnoceni-morfologie-nebo-morfokinetiky-4921>
- [78] NL - CLINIC GEST IVF S.R.O. *Time lapse embryo monitoring* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.gest.cz/time-lapse-embryo-monitoring>
- [79] REPROGENESIS. *Embryomonitoring* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.reprogenesis.cz/lecba-neplodnosti/metody-lecby-neplodnosti/embryomonitoring/>
- [80] KOVACS, Peter. *Embryo selection* [online]. [cit. 2020-06-27]. DOI: 10.1186/1477-7827-12-124. Dostupné z: <http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-12-124>
- [81] NOVA VITA. *In vitro fertilisation treatment (IVF,ICSI, FET)* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://novavita.ee/en/in-vitro-fertilisation-treatment-ivf-icci/>

- [82] NOVA VITA. *EmbryoScope is a new type of embryo culturing and observation device* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.ovumia.fi/en/embryoscope/>
- [83] IVF CUBE. *Genetické testování* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://ivf-cube.eu/geneticke-testovani>
- [84] ORM GENOMICS. *PGT-A, PGT-M, and PGT-SR, what do all these acronyms mean?* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://ormgenomics.com/2018/09/20/pgt-what-does-it-all-mean/>
- [85] VAŠE LABORATOŘE. *PGT-A: Preimplantační genetické testování aneuploidii* [online]. 2019 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/molekularni-biologie/item/pgt-a-preimplantacni-geneticke-testovani-aneuploidii>
- [86] GENNET. *PGT-A* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/pgt-a>
- [87] VITROLIFE. *WHAT IS PGT-A?* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.vitrolife.com/products/pgt/pgt-a/>
- [88] REPROMEDA. *PGT-A: Preimplantační genetické testování aneuploidii* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.repromeda.cz/poskytovana-pece/genetika/preimplantacni-geneticka-diagnostika/pgd-translokaci/>
- [89] SANATORIUM HELIOS. *Analýza výsledků – metoda NGS* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.sanatoriumhelios.cz/analyza-vysledku-metoda-ngs/>
- [90] MARTIN, Julio. *Preimplantation Genetic Testing* [online]. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: [https://genotipia.com/wp-content/uploads/2019/04/PGT\\_Titulo-Experto-GMedyGen\\_2019.pdf](https://genotipia.com/wp-content/uploads/2019/04/PGT_Titulo-Experto-GMedyGen_2019.pdf)
- [91] SANATORIUM HELIOS. *Preimplantační genetické testování (PGT)* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.sanatoriumhelios.cz/preimplantacni-geneticke-testovani-pgt/>
- [92] IVF ZENTREN PROF. ZECH. *PGT-M* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.ivf-institut.cz/kinderwunsch-behandlung.php?c=genetik-pgt-m-indikationen-analyse-behandlung>
- [93] CENTRUM ASISTOVANÉ REPRODUKCE BRNO. *Preimplantační genetické testování (PGD)* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <http://www.ivfbrno.cz/preimplantacni-geneticke-testovani-pgd/t1035>

- [94] OVATION FERTILITY. *PGT-M Testing* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.ovationfertility.com/pgt-m-testing/>
- [95] GENNET. *PGT* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/pgt>
- [96] REPROMEDA. *PGT-M: Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.repromeda.cz/poskytovana-pece/genetika/preimplantacni-geneticka-diagnostika/pgd-monogennich-chorob/>
- [97] SANATORIUM HELIOS. *PGT-M* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.sanatoriumhelios.cz/pgt-m/>
- [98] REPROMEDA. *PGT-SR: Preimplantační genetické testování strukturních chromozomových vad* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.repromeda.cz/poskytovana-pece/genetika/preimplantacni-geneticka-diagnostika/pgt-t-translokace/>
- [99] OVATION FERTILITY. *PGT-SR Testing* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.ovationfertility.com/pgt-sr-testing/>
- [100] COONEN, Edith, Carmen RUBIO, Dimitra CHRISTOPIKOU, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations† [online]. [cit. 2020-06-27]. DOI: 10.1093/hropen/hoaa017. Dostupné z: <https://academic.oup.com/hropen/article/doi/10.1093/hropen/hoaa017/5848300>
- [101] IVF ZENTREN PROF. ZECH. *PGT-SR* [online]. 2020 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.ivf-institut.cz/kinderwunsch-behandlung.php?c=genetik-pgt-sr-indikationen-analyse-behandlung>
- [102] *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology: Assisted hatching in assisted reproduction.* 2002. Dostupné také z: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1471-0528.2002.t01-1-01005.x>
- [103] LÉKAŘI-ONLINE.CZ. *Asistovaný hatching* [online]. 2020 [cit. 2020-06-29]. Dostupné z: <https://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/asistovany-hatching>
- [104] INVITRA. *What Does Assisted Hatching (AHA) Mean in IVF?* [online]. 2020 [cit. 2020-06-29]. Dostupné z: <https://www.invitra.com/en/assisted-hatching/>

- [105] AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *Assisted Reproductive Technology* [online]. [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.reproductivefacts.org/globalassets/rf/news-and-publications/bookletsfact-sheets/english-fact-sheets-and-info-booklets/art-booklet2.pdf>
- [106] ZDRAVOTNICTVÍ A MEDICÍNA. *Transfer embrya a substituce luteální fáze* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/transfer-embrya-a-substituce-lutealni-faze-134350>
- [107] LÉKAŘI-ONLINE.CZ. *Embryotransfer: Vše, co jste o asistované reprodukci nevěděli* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.lekari-online.cz/gynekologie-a-porodnictvi/novinky/embryotransfer-vse-co-jste-o-asistovane-reprodukci-nevedeli>
- [108] AMERICAN PREGNANCY ASSOCIATION. *Embryo Transfer* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://americanpregnancy.org/infertility/embryo-transfer/>
- [109] MEDICAL NEWS TODAY. *What to know about embryo transfers* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/314571>
- [110] LOMA LINDA UNIVERSITY CENTER FOR FERTILITY & IVF. *Elective Single Embryo Transfer (eSET)* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://lomalindafertility.com/treatments/ivf/eset/>
- [111] MEDICAL PRONATAL GROUP. *Vícečetné těhotenství po asistované reprodukci: – v současnosti již jen historická komplikace?* [online]. [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <http://www.neonatology.cz/upload/www.neonatology.cz/xxiikonference/asistovana-reprodukce-v-soucasnosti.pdf>
- [112] REPROFIT. *Nejčastěji kladené otázky k léčbě IVF* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.reprofit.cz/lecba-ivf/faq-nejcasteji-kladene-otazky/#faq4>
- [113] TRÁVNÍK, Pavel. *Detekce plodnosti a těhotenství – v čem může pomoci lékárník?* [online]. [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2017/03/07.pdf>
- [114] INVITRA. *IVF Embryo Transfer Procedure – Definition, Process & Tips* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.invitra.com/en/what-is-embryo-transfer/>
- [115] NATALART S.R.O. *Kryokonzervace a vitrifikace* [online]. [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <http://www.natalart.cz/index.php/cs/lecebne-metody/kryokonzervace-embryi>

- [116] PRONATAL. *Kryokonzervace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://pronatal.cz/cs/umele-oplodneni/kryokonzervace>
- [117] GENNET. *Mražení pohlavních buněk* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/mrazeni-pohlavnich-bunek>
- [118] ZDRAVOTNICTVÍ A MEDICÍNA. *Kryokonzervace spermií a embryí* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/kryokonzervace-spermii-a-embryi-134352>
- [119] GYNCENTRUM OSTRAVA S. R. O. *Kryokonzervace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://www.gynecentrum.com/cs/kryokonzervace>
- [120] CENTRUM ASISTOVANÉ REPRODUKCE BRNO. *Kryokonzervace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <http://www.ivfbrno.cz/kryokonzervace/t1193>
- [121] REPROMEDA. *Kryokonzervace a vitrifikace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://www.repromeda.cz/poskytovana-pecce/lecba-neplodnosti/ivf/kryokonzervace/>
- [122] REPROFIT. *Kryokonzervace a vitrifikace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://www.reprofit.cz/umele-oplodneni/kryokonzervace-a-vitrifikace/>
- [123] KONC, János, Katalin KANYÓ, Rita KRISTON, Bence SOMOSKŐI a Sándor CSEH. *Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction* [online]. [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1155/2014/307268. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/307268/>
- [124] REPROGENESIS. *Kryokonzervace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://www.reprogenesis.cz/lecba-neplodnosti/metody-lecby-neplodnosti/kryokonzervace/>
- [125] ISCARE. *Kryokonzervace* [online]. 2020 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <https://www.iscare.cz/ivf/laboratorni-metody/kryokonzervace>
- [126] DRLAHLALI.ORG. *Jak a proč se provádí kryoprezervace spermií (zmrazení)?* [online]. 2017 [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: [http://cs.drlahlali.org/urologiya\\_zamorozka-spermy-kriokonservatsiya.html](http://cs.drlahlali.org/urologiya_zamorozka-spermy-kriokonservatsiya.html)
- [127] WINFERTILITY. *Top 6 reason for failed fertility* [online]. 2020 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://www.winfertility.com/blog/top-6-reasons-for-failed-fertility-treatments/>
- [128] DR. DIMITRIOS GOULIS. *Ovarian hyperstimulation syndrome* [online]. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <http://www.drgoulis.gr/en/article/48/OVARIAN-HYPERSTIMULATION-SYNDROME/>

- [129] RADIOLOGY KEY. *Ultrasound and Ovarian Hyperstimulation Syndrome* [online]. 2016 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://radiologykey.com/ultrasound-and-ovarian-hyperstimulation-syndrome/#Fig3>
- [130] WINFERTILITY. *Risks of IVF- six rare complications of IVF treatment* [online]. 2020 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://www.winfertility.com/blog/risks-ivf-six-rare-complications-ivf-treatment/>
- [131] *Multiple Pregnancies Following Assisted Conception* [online]. [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.3109/14647273.2011.552010. ISSN 14700328. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1471-0528.14974>
- [132] REPRODUCTIVE SCIENCE CENTER OF THE BAY AREA. *Ectopic Pregnancy and IVF: A Recent Risk Reduction* [online]. 2020 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://rsbayarea.com/blog/ectopic-pregnancy-and-ivf>
- [133] YORDE, Nicole, Reshef TAL a J.Ryan MARTIN. *Abdominal ectopic pregnancy after in vitro fertilization and single embryo transfer: a case report and systematic review* [online]. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-016-0201-x#citeas>
- [134] FERTILITYPEDIA.ORG. *Ectopic pregnancy* [online]. 2020 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://fertilitypedia.org/edu/risk-factors/ectopic-pregnancy>
- [135] MIMODĚLOŽNÍ TĚHOTENSTVÍ - VŠE O MIMODĚLOŽNÍM TĚHOTENSTVÍ. *Mimoděložní těhotenství - formy* [online]. 2020 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <http://www.mimodelozni-tehotenstvi.cz/component/content/article?id=270:mimodelozni-tehotenstvi-formy>
- [136] PROLÉKAŘE.CZ. *Možnosti transplantace dělohy v České republice – indikace, výzkum a klinické zkušenosti* [online]. 2020 [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2017-1/moznosti-transplantace-delohy-v-ceske-republice-indikace-vyzkum-a-klinicke-zkusenosti-60425>
- [137] JOHANNESSON, Liza a Stina JÄRVHOLM. *Uterus transplantation: current progress and future prospects* [online]. [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.2147/IJWH.S75635. ISSN 1179-1411. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/uterus-transplantation-current-progress-and-future-prospects-peer-reviewed-article-IJWH>
- [138] FUTURE US. *Future of Fertility Treatment: 7 Ways Baby-Making Could Change* [online]. 2020 [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: <https://www.livescience.com/46578-future-fertility-treatments.html>

- [139] ČESKÝ ROZHLAS. *Žena s transplantovanou dělohou porodila dítě v motolské nemocnici. V Česku je to první případ* [online]. 2020 [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: [https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/nemocnice-motol-porod-transplantovana-deloha\\_1909170928\\_zit](https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/nemocnice-motol-porod-transplantovana-deloha_1909170928_zit)
- [140] KISU, I, K BANNO, Y MATOBA, M ADACHI a D AOKI. *Current Status of Uterus Transplantation and Approaches for Future Clinical Application in Japan* [online]. [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041134518304639>
- [141] NEW HOPE FERTILITY CLINIC. *Designer Babies* [online]. 2020 [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: <https://www.newhopefertility.com/designer-babies/>
- [142] GUARDIAN NEWS & MEDIA. *Three-person IVF: UK government backs mitochondrial transfer* [online]. 2020 [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: <https://www.theguardian.com/science/2013/jun/28/uk-government-ivf-dna-three-people>
- [143] EXTRA PUBLISHING, S. R. O. *Máma, táta a ten třetí: Proč nové techniky umělého oplodnění vzbuzují vášně?* [online]. 2011 [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: <https://www.stoplusjednicka.cz/mama-tata-ten-treti-proc-nove-techniky-umeleho-oplodneni-vzbuzuji-vasne>