

**MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Vývoj a podíl klinické embryologie v programu  
asistované reprodukce**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

komentovaný soubor prací

## **PODĚKOVÁNÍ**

Práce vznikla na základě mé mnohaleté činnosti v embryologické a andrologické laboratoři Centra asistované reprodukce Gynekologicko - porodnické kliniky LF MU a FN Brno.

Upřímně děkuji přednostovi Gynekologicko – porodnické kliniky LF MU a FN Brno a vedoucímu Centra asistované reprodukce prof. MUDr. Pavlu Ventrubovi, DrSc., MBA, za jeho dlouholeté vedení, spolupráci, podporu, důvěru ve výsledky mé laboratorní práce a cenné rady a připomínky k rukopisu této práce.

Poděkování patří i celému kolektivu Centra asistované reprodukce. Děkuji také doc. MUDr. Igoru Crhovi, CSc. a doc. MUDr. Martinu Huserovi, Ph.D. za tvůrčí spolupráci. Dále pak bývalým i současným spolupracovnícím z embryologické a andrologické laboratoře, zvláště Ing. Evě Lousové a Bc. Haně Pochopové.

Ráda bych poděkovala své rodině za podporu, trpělivost a pochopení pro moji práci.



## OBSAH

ÚVOD.....	5
A. PŘEHLED PROBLEMATIKY PŘED OBDOBÍM INOVAČNÍCH PŘÍSTUPŮ .....	8
B. CÍLE PRÁCE.....	10
C. ZPŮSOB ZPRACOVÁNÍ.....	11
D. METODY KLINICKÉ EMBRYOLOGIE Z OBDOBÍ INOVAČNÍCH PŘÍSTUPŮ A PŘÍTOMNOSTI .....	12
<b>1. Kultivace gamet a embryí.....</b>	<b>13</b>
1.1. Kultivační podmínky.....	13
1.2. Prodloužená kultivace embryí metodou kokultivace.....	17
1.3. Média pro prodlouženou kultivaci embryí.....	21
<b>2. Mikromanipulační techniky.....</b>	<b>45</b>
2.1. Fertilizační techniky.....	45
2.1.1. Techniky získání spermií z nadvarlete a varlete.....	50
2.1.2. Zpracování spermií při retrográdní ejakulaci .....	53
2.2. Asistovaný hatching u embryí .....	54
2.3. Biopsie buněk .....	56
<b>3. Kryokonzervace gamet, embryí a tkání.....</b>	<b>86</b>
3.1. Kryokonzervace spermatu a testikulární tkáně.....	89
3.1.1. Kryokonzervace spermatu u partnerů IVF pacientek a zdravých mužů.....	90
3.1.2. Kryokonzervace spermatu dárců a spermabanka.....	91
3.1.3. Kryokonzervace spermatu u onkologických pacientů.....	93
3.2. Kryokonzervace embryí.....	95
3.3. Kryokonzervace oocytů.....	98
3.4. Kryokonzervace ovariální tkáně jako ochrana fertility.....	100
<b>4. Hodnocení kvality gamet a embryí.....</b>	<b>172</b>
4.1. Hodnocení kvality oocytů a spermií.....	172
4.2. Hodnocení kvality embryí.....	180
4.2.1. Kontinuální monitoring vývoje embryí.....	185
<b>5. Perspektivy klinické embryologie a vývoj moderních metod.....</b>	<b>203</b>
<b>6. Data z evropského a českého registru.....</b>	<b>205</b>

E. DISKUSE.....	206
F. ZÁVĚR .....	209
G. PUBLIKACE AUTORKY ZAŘAZENÉ V TEXTU .....	212
H. SEZNAMY.....	215
<b>1. Seznam řešených grantů .....</b>	<b>215</b>
<b>2. Seznam zkratk.....</b>	<b>216</b>
<b>3. Seznam obrázků.....</b>	<b>218</b>
<b>4. Seznam tabulek.....</b>	<b>220</b>
I. LITERATURA.....	221
J. SOUHRN.....	232
K. SUMMARY.....	234

## ÚVOD

V posledních třiceti letech přinesla reprodukční medicína řadu úspěchů v léčbě neplodných párů. Jejich počet stále narůstá a ve společnosti je jich v současné době 15 až 20 %. Z dříve téměř tabuizovaného tématu se poruchy plodnosti staly celospolečenskou a často diskutovanou záležitostí, neboť nejsou jen problémem zdravotním, ale i socioekonomickým. Veřejnost se stále častěji setkává s pojmy reprodukční medicína a asistovaná reprodukce (AR).

Narození Luise Brownové v roce 1978 v Anglii, prvního dítěte po technice in vitro fertilizace a embryotransferu (IVF/ET), bylo průlomovým bodem v léčbě neplodnosti a výsledkem mnohaletého výzkumu, úsilí a péle, v jehož čele stáli embryolog Robert Edwards (obr. 1) a gynekolog Patric Steptoe [90]. Mímotělní oplození vajíčka a přenos embrya do dělohy se tak dostaly z výzkumných laboratoří do klinické praxe. Postupem doby následoval rozvoj v celosvětovém měřítku a byla vyvinuta řada dalších technik a metod, které jsou souhrnně nazývány metodami nebo technikami asistovaná reprodukce (ART). V roce 2010 byly zásluhy profesora Edwardse oceněny udělením Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu.

Porodu prvního dítěte za pomoci metod asistované reprodukce v České republice bylo dosaženo již v roce 1982 na I. gynekologicko – porodnické klinice LF MU v Brně ve Fakultní porodnici na Obilním trhu [71]. Šlo o první porod v bývalém Československu i střední a východní Evropě, který byl dosažený metodou transferu vajíček a spermií do vejcovodu během mikrochirurgického výkonu. Tato brněnská modifikace „IVF“ vycházející z improvizovaných podmínek byla v roce 1984 zavedena do literatury pod názvem GIFT (Gamete IntraFallopian Transfer) [3] a o dalších několik roků později uznána světovou prioritou.

Našemu pracovišti se dařilo i nadále udržet kontakt se světem. Prvního porodu po klasickém IVF/ET, tedy metodě oplození oocyty mimo organismus ženy, kultivaci in vitro a následném embryotransferu, zde bylo dosaženo v roce 1984 [72]. Pracovníci Gynekologicko – porodnické kliniky v Brně na Obilním trhu (prof. Zdeněk Čupr, prof. Ladislav Pilka a následně prof. Pavel Ventruba) se věnovali diagnostice a léčbě neplodnosti již od 70. let 20. století. S rozšiřováním klinických poznatků a praktickými zkušenostmi s léčbou neplodnosti novými preparáty na ovariální stimulaci a zvláště s rozvojem laboratorních metod od 90. let 20. století, byla od této základní metody odvozena a vyvinuta řada dalších postupů. Tyto techniky, které vyžadují bezprostřední in vitro manipulaci se zárodečnými buňkami a embryi, přispěly k léčbě poruch plodnosti páru téměř ve všech faktorech sterility - tubární, nevysvětlitelné a imunologické,

endometriózy, při snížené plodnosti muže či v případech vyžadujících darování gamet.

Od roku 1989 pracuje autorka v embryologické laboratoři centra, kde se narodilo „první české dítě ze zkumavky“. Dostala tak příležitost být na pracovišti, které se kromě praktické činnosti zabývalo a trvale zabývá i vědecko-výzkumnou stránkou léčby neplodnosti a vývojem technologií dostupných v tehdejších podmínkách. Právě zde a v této době se ruku v ruce s gynekologickou částí asistované reprodukce začala dynamicky rozvíjet i stránka laboratorní.

Autorka se účastnila a přispěla vlastní prací k zavádění nových metod, jako byla optimalizace kultivačních podmínek, prodloužení délky kultivace embryí in vitro za hranici 48 hodin, hodnocení kvality gamet a embryí. Zaváděla mikromanipulační techniky, které primárně sloužily k řešení andrologického faktoru sterility a které se později začaly používat i pro další účely. Díky mikromanipulacím se rozvíjela významná oblast preimplantační genetické diagnostiky. Hledaly se stále efektivnější postupy kryokonzervace a uchování zmrazeného biologického materiálu. Na základě fungující kryokonzervace byla založena vlastní spermabanka pracoviště a byly rozvinuty programy dárcovství gamet a embryí i program ochrany fertility u onkologicky nemocných. Tyto zaváděné postupy a metody jsou národními prioritami a byly postupně zaváděny na nově vznikajících centrech asistované reprodukce v České republice.

Veškerá činnost je trvale vedena snahou celého kolektivu Centra asistované reprodukce Gynekologicko – porodnické kliniky LF MU a FN Brno, poskytovat svým pacientům ty nejmodernější postupy a metody, které jsou v danou dobu možné, a být tak svojí kvalitou pracovištěm srovnatelným s předními evropskými a světovými pracovišti.

Obor klinická embryologie existuje v České republice prakticky již 30 let. Avšak oficiálně byl zřízen „Nařízením vlády č. 31/2010 Sb. ze dne 11. ledna 2010 o oborech specializačního vzdělávání a označení odbornosti zdravotnických pracovníků se specializovanou způsobilostí“. Klinická embryologie se zabývá diagnostickými a léčebnými výkony s lidskými zárodečnými buňkami a embryi, je náročná na kvalifikaci a na manuální zručnost pracovníků. Úzce spolupracuje s gynekology – reprodukčními specialisty při léčbě poruch plodnosti. Praktické zaměření oboru a praktické kompetence embryologů jsou určeny ve Vyhlášce č. 55/2011 Sb. ze dne 1. března 2011 o činnostech zdravotnických pracovníků a jiných odborných pracovníků.

Postupy prováděné v embryologické laboratoři proto nazýváme metodami a technikami klinické embryologie.



Obr. 1: Osobní setkání autorky s nositelem Nobelovy ceny, prof. Robertem Edwardsem

## A. PŘEHLED PROBLEMATIKY PŘED OBDOBÍM INOVAČNÍCH PŘÍSTUPŮ

Období 1978 až 1990 můžeme nazvat pionýrským obdobím IVF, kdy zvláště entusiasmus vytvářel realitu ze snů a nemožné dělal možným. První úspěch Edwardse a Steptoa v roce 1978 byl teprve start, přestože byl podpořený již desetiletými intenzivního výzkumu na zvířatech a také na člověku. Vytvořit novou vědu a udělat z IVF oblast humánní medicíny s odpovídající účinností a trvalými výsledky, vyžadovalo vysoce kreativní týmy silných, pracovitých a nezávislých kliniků a embryologů. Před kliniky a embryology stála obrovská výzva nejen ze strany psychologických a morálních bariér. Se zaváděním nových metod byly spojeny také problémy technického rázu, neboť nebyly žádné dostupné přístroje a pomůcky.

Pro laboratoř bylo nutno vyvinout kultivační zařízení a zvládnout náročnou přípravu kultivačních médií, o což se velkou měrou zasloužil prof. Trávník [95, 97]. Své místo měla vlastní výroba punkčních souprav pro odběr oocytů a transferových souprav z upravených jehel a teflonových hadiček.

V embryologické laboratoři se provádělo několik základních úkonů. Zpracování spermií pro intrauterinní inseminace nebo oplozování oocytů. Vlastní oplozování oocytů se provádělo přidáním vypočteného množství spermií do zkumavky s oocyty v kultivačním médiu [94]. V případech andrologického faktoru neplodnosti, při snížených parametrech spermioqramu partnera, bylo jedinou pomocí použití spermatu dárce. Vzhledem k možnostem kultivačního systému a kvalitě kultivačních médií, která nebyla ještě tak dokonalá, byla kultivace in vitro omezena maximálně na 48 hodin. Po této době byla embrya již transferována do dělohy. Své využití postupně nacházela i kryokonzervace spermií a časných embryí. Techniky kryokonzervace se vyvíjely z kryokonzervačních technik používaných a ověřených u zvířat [100, 116].

Klinický mezník umělého oplození spočíval v hormonální stimulaci ovaríí pacientek [19, 47], neboť první dosažená těhotenství pocházela z nestimulovaných cyklů. Rozvoj ultrazvukové technologie umožnil nahradit laparoskopický odběr oocytů [61, 103] jednodušším odběrem transvaginálním, prováděným pod kontrolou ultrazvuku [104]. I v této metodě patří naše centrum ke světovým průkopníkům. Transfer embryí se postupně přestal provádět chirurgickou cestou a byl nahrazen vaginálním přístupem.

V roce 1985 byla v Bonnu odborníky zabývajícími se touto problematikou ustavena European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), která začala pravidelně pořádat sympozia, praktické kurzy, výroční setkání. Od roku 1986 vydává vlastní časopis Human Reproduction. Díky těmto aktivitám došlo k rychlejší aplikaci nových poznatků do praxe.

Nové technologie se začaly rozvíjet nejen díky novým praktickým a vědeckým poznatkům, ale také díky vývoji přístrojů, nástrojů, laboratorních pomůcek a médií a jejich komerční dostupnosti.

Asistovaná reprodukce se od roku 1990 stala uznávaným mezioborovým odvětvím lidské medicíny, ve kterém spolupracují odborníci z oblastí gynekologie, embryologie, genetiky, urologie, andrologie, endokrinologie, molekulární biologie, psychologie, sociologie i výpočetní techniky.

## **B. CÍLE PRÁCE**

Cílem habilitační práce je podat přehled o nejdůležitějších metodách a technikách klinické embryologie, jejichž zavádění, rozvoj a praktické využití autorka sama v embryologické laboratoři prováděla. Autorka si je vědoma, že není možné zahrnout do jedné práce všechny dostupné informace a dosažené výsledky. Neklade si za cíl předložit kompletní a podrobný přehled všech metod a technik klinické embryologie. Práce vychází ze zveřejněných publikací a grantových úkolů řešených na jednotlivá témata na pracovišti asistované reprodukce Gynekologicko – porodnické kliniky LF MU a FN Brno.

Cílem práce je rozebrat metody a postupy tak, jak v léčebném procesu na sebe navazují, případně k jakému dalšímu využití jsou vhodné:

### **1. Kultivace gamet a embryí**

Popsat způsoby hodnocení kultivačních podmínek (studium ultrastruktury buněk). Uvést vývoj metod prodloužení délky kultivace embryí in vitro za hranici 48 hodin (společná kultivace embryí s lidskými ovidukálními buňkami, syntetické médium) a jejich zavedení do praxe.

### **2. Mikromanipulační techniky**

Podat přehled o zavádění mikromanipulačních technik a jejich využití v asistované reprodukci. Fertilizační techniky, technika asistovaného hatchingu u embryí a biopsie buněk pro preimplantační genetickou diagnostiku.

### **3. Kryokonzervace gamet, embryí a zárodečných tkání**

Seznámit se zavedením kryokonzervačních technik. Uvést možnosti využití kryokonzervace buněk a tkání pro léčbu neplodnosti, v programu dárcovství, pro účely ochrany fertility onkologických pacientů a pro využití do budoucna.

### **4. Hodnocení kvality gamet a embryí**

Uvést způsoby a možnosti hodnocení kvality oocytů, spermií a embryí. Seznámit s využitím a výhodami kontinuálního monitorování vývoje při hodnocení kvality embryí.



## C. ZPŮSOB ZPRACOVÁNÍ

Členění habilitační práce do jednotlivých kapitol odpovídá příslušným laboratorním technikám. V každé kapitole je kromě teoretického přehledu dané problematiky zahrnuta část, která vychází z praktických výsledků naší práce. Tato část je potom členěna na úvod, materiál a metodiku, výsledky a závěr.

Text práce vychází z 23 publikovaných prací autorky, které se k danému tématu vážou a jsou za příslušnou kapitolu zařazeny. Publikace jsou označeny římskými číslicemi I až XXIII. Seznam všech komentovaných publikací autorky zařazených v textu je uveden na str. 212 - 214.

„Závěr“ habilitační práce shrnuje nejdůležitější výsledky a poznatky ze všech kapitol.

„Literatura“ uvádí citace z jednotlivých kapitol, komentovaných publikací i zásadní citace z příložených publikací, a to abecedně dle jména prvního autora. Formální úprava citací se řídí ČSN ISO 690.

Fotografie zařazené v textu jsou dílem autorky této práce. Autorem fotografií (obr. 4, 5, 6) je doc. MUDr. M. Sedláčková, CSc., Ústav histologie a embryologie LF MU Brno.

## **D. METODY KLINICKÉ EMBRYOLOGIE Z OBDOBÍ INOVAČNÍCH PŘÍSTUPŮ A PŘÍTOMNOSTI**

Metody asistované reprodukce (AR) jsou prováděny ve vzájemné součinnosti a návaznosti klinické a embryologické části. Klinická část řeší kontrolovanou stimulaci vaječnicků, načasování odběru oocytů nebo intrauterinní inseminace, vlastní odběr oocytů a transfer embryí do dělohy. Embryologická část obnáší veškeré manipulace s oocyty a spermiemi od jejich získání, metody oplozování oocytů, dále kultivaci, manipulace a hodnocení embryí in vitro až po předání embrya/í k transferu do dělohy a kryokonzervaci gamet a embryí.

**V klinické oblasti** AR se od 90. let 20. století řešily a vyvíjely postupy pro získání co největšího počtu kvalitních oocytů. Vedle stimulace růstu oocytů bylo nutné zajistit i kontrolu ovulace, prevenci jejího předčasného nástupu a uvolnění vajíček z vaječnicku. Úspěšnost léčby byla optimalizována individuálním přístupem k ovariální stimulaci u každé ženy a s ohledem na klíčové momenty, jako je výběr vhodného stimulačního protokolu, správné přizpůsobení dávek gonadotropinů, aby nedošlo k rozvoji hyperstimulačního syndromu a individuální načasování podání hCG. Gonadotropiny pro stimulaci prošly vývojem od urinárních hMG (FSH + LH) přes čištěné po rekombinantní FSH a rekombinantní LH. K zabránění předčasnému peaku LH, a tím mnohdy zrušení celého výkonu, se začaly využívat GnRH analoga. V průběhu vývoje a zavádění nových a modernějších preparátů byly postupně modifikovány stimulační protokoly (ultrakrátký a krátký protokol, dlouhý protokol z folikulární fáze, dlouhý protokol z luteální fáze a protokol s antagonisty GnRH), které mohly být přizpůsobeny pacientkám podle věku, kvality ovariální odpovědi na stimulaci, ovariální rezervě a dalším faktorům. [107, 109]. Samostatnou otázkou je nativní, přirozený cyklus, kdy se nepoužívají žádné hormonální léky k ovariální stimulaci. Využívá se přirozené ovulace.

**V embryologické laboratoři** centra AR se od 90. let 20. století odehrála řada revolučních změn zavedením nových metod a zakoupením moderních přístrojů. Na počátku bylo hledání způsobů, jak zkvalitnit kultivační podmínky pro gamety a embrya. Následoval rozvoj do té doby nepoužívaných mikromanipulačních technik, vázaných na technicky složité a finančně náročné přístroje. Zavedení kryokonzervačních metod a ověření jejich spolehlivosti dalo vzniknout programu dárcovství spermií, embryí a programu ochrany fertility. Trvalý zájem se

soustředoval také na hledání způsobů jak spolehlivěji a pregnantněji hodnotit kvalitu gamet a zvláště potom vzniklých embryí.

## 1. KULTIVACE GAMET A EMBRYÍ

Při práci s gametami a embryi in vitro je nejdůležitějším předpokladem vhodné kultivační prostředí. Je představováno CO<sub>2</sub> inkubátorem, který zajišťuje plynné složení, teplotu a vlhkost. Dále tekutým kultivačním médiem saturovaným plynnou fází, v níž jsou jednotlivé plyny zastoupeny příslušnými parciálními tlaky a nádobkami (zkumavky, misky) v nichž jsou gamety a embrya umístěna.

Používaná **kultivační média** byla připravována na pracovišti. V co nejdokonaleji čisté vodě po chemickém odstranění nečistot a redestilaci [96] byly rozpuštěny jednotlivé chemikálie a další složky média. Základem médií byl hydrogenkarbonátový pufr. Dalšími složkami byly kationty a anionty v koncentraci obdobné jako v krevním séru s dodržením osmotické koncentrace asi 280 mmol/l. Jako zdroj energie pro embryo byl přidáván pyruvát a laktát a pro spermie glukóza. Lidský nebo hovězí sérový albumin sloužil jako zdroj bílkovin. Pro zabránění mikrobiální kontaminace ze vzduchu nebo biologického materiálu se přidával penicilin a streptomycin. Fenolová červeň se používala jako indikátor pH. Sterilizace média byla prováděna přetlakovou filtrací přes miliporový filtr [23]. V 90. letech jsme používali Earlovo médium (Sigma), které bylo dostupné v podobě prášku a rozpouštělo se v redestilované vodě. Postupně byla na trh uváděna média firem MediCult (Dánsko), Scandinavian IVF Science dnešní Vitrolife (Švédsko), COOK (Austrálie), SAGE (USA) a další.

Rychlým vývojem procházely **CO<sub>2</sub> inkubátory**. Od nejjednoduššího inkubátoru (fy Labotect), který jsme používali v 90. letech 20. století jsme postupně přecházeli k dokonalejším CO<sub>2</sub> inkubátorům s elektronicky nastavitelnými hodnotami teploty a koncentrace CO<sub>2</sub> ve vzduchu, firem Heraeus, Binder (obr. 2) a Sanyo (obr. 3).

### 1.1. Kultivační podmínky

V letech 1995 až 1996 jsme se zabývali studiem našich kultivačních podmínek, jejichž kvalitu jsme hodnotili zprostředkovaně přes **kvalitu buněk cumulus oophorus** z komplexu oocyt-cumulus oophorus po oplození lidského oocytu in vitro. Řešili jsme grantový úkol I. kategorie **IGA MZ ČR č. 2703-2 „Vztahy mezi buňkami cumulus oophorus a časným embryem při**

**kultivaci in vitro“** [123].

Prostředí pro oplození oocytů a vývoj časných embryí se odlišuje od podmínek in vivo zejména v tom, že probíhá vždy při vyšší koncentraci kyslíku. Vývoj za těchto podmínek může vést k vyšší koncentraci kyslíkových radikálů a reaktivních formací kyslíku. Produkce ROS (reactive oxygen species) může být vyvolána kultivačním prostředím nebo mohou být jejich zdrojem buňky cumulus oophorus, oocyty a spermie. Vysoké hladiny ROS, zejména superoxidu



Obr. 2: CO<sub>2</sub> inkubátor Binder pro kultivaci embryí



Obr. 3: CO<sub>2</sub> inkubátor Sanyo pro kultivaci embryí

a peroxidu vodíku, v kultivačním prostředí mohou být jednou z možných příčin selhání fertilizace in vitro, fragmentace embryí a narušení až zástavy embryonálního vývoje.

V letech 1999 až 2001 jsme se věnovali studiu peroxizomů [92], peroxidázové aktivity a detekci zdrojů peroxidu vodíku v kultivačním systému [83, 84, 91]. Řešili jsme grantový úkol **IGA MZ ČR č. 5164-3 „Identifikace peroxisomů a jejich úloha v eliminaci poškození lidských zárodečných buněk kyslíkovými radikály při in vitro fertilizaci“** [127].

V průběhu kultivace jsou kumulární buňky obklopující oocyt kultivovány společně s oocytem 20 hodin od inseminace. Poté jsou od oocytu mechanicky odstraňovány, aby bylo možno zjistit, zda jsou přítomna prvojádra a oplození bylo úspěšné. Kumulární buňky se stávají v tuto dobu již odpadním materiálem. Byly použity jako studijní materiál a zpracovány pro elektronovou mikroskopii. Na základě posouzení jejich ultrastruktury i ultrastruktury spermií ve vzorcích obsažených jsme usuzovali na kvalitu kultivačních podmínek. Analýza submikroskopické stavby buněk napomohla rovněž určit pravděpodobné možné příčiny selhání oplození.

Výsledky studia kumulárních buněk jsou dokumentovány v **Publikaci I a Publikaci II**.

#### **Materiál a metodika:**

Odebrané buňky cumulus oophorus byly zpracovány pro elektronově mikroskopické vyšetření. Byly fixovány glutaraldehydem s přidavkem kyseliny tříslové a postfixovány osmiumtetroxidem a uranylacetátem. Po odvodnění vzestupnou řadou alkoholů byly zality do Durcupanu ACM. Kontrastované ultratenké řezy byly krájeny na ultramikrotomu LKB. Pozorování a fotografování bylo prováděno v elektronovém mikroskopu Tesla BS 500 na Ústavu histologie a embryologie LF MU v Brně [126].

Na základě výsledků oplození byl materiál od pacientek rozdělen do 3 skupin na buňky od neoplozených oocytů, buňky od oplozených oocytů (bez těhotenství) a buňky od oplozených oocytů (s těhotenstvím) [121].

Byla hodnocena i kvalita spermií na základě jejich ultrastruktury [124]. Byly vyšetřeny vzorky kumulárních buněk se spermiemi. Počet spermií v jednotlivých vzorcích byl různý, většinou 20 až 50 průřezů hlavičkou a dvojnásobný počet průřezů bičíkem v jednom vzorku.

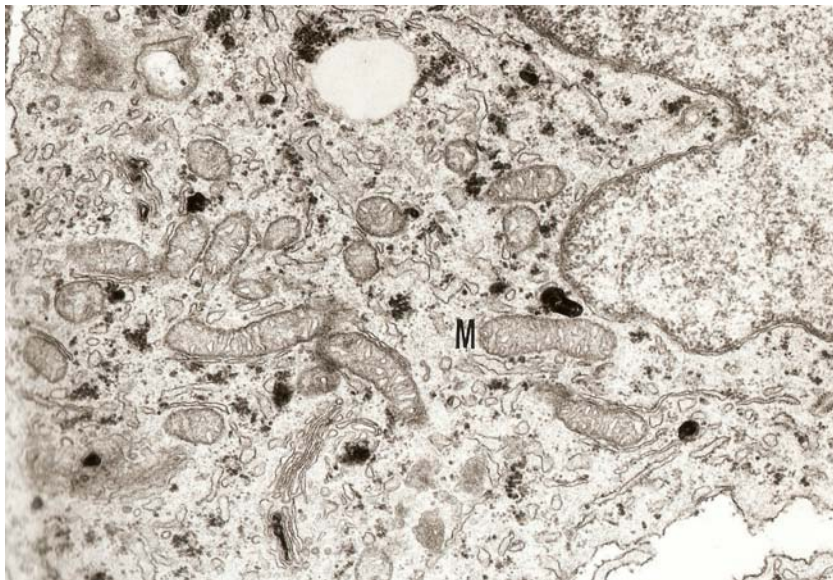
#### **Výsledky:**

1. Většina nálezů svědčila pro velmi **dobrou kvalitu kultivačního prostředí**. Převaha buněk byla aktivních, obsahujících jádro s jemně rozptýleným chromatinem a bohatě zastoupené

organely (obr. 4, 5).

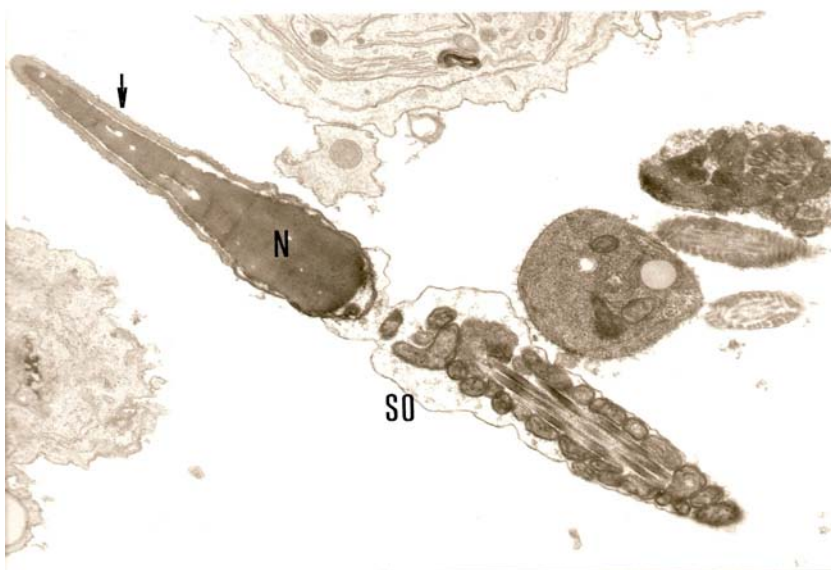


Obr. 4: Buňka cumulus oophorus preovulačního oocyta, světlé jádro (N), v cytoplasmě bohatá organelová výbava. Lipidové kapky (L), extracelulární matrix (ECM).  
Foto: Sedláčková, zvětšení: 6 400 x



Obr. 5: Část buňky cumulus oophorus od oplozeného oocyta. Mitochondrie s tubulózními kristami (M). Foto: Sedláčková, zvětšení: 23 000 x

2. Byly hodnoceny spermie z mezibuněčných prostorů kumulu i spermie, které penetrovaly do folikulárních buněk. **Ultrastruktura buněk i spermií byla dobře zachována**, což svědčilo o dobré kvalitě kultivačních podmínek (obr. 6).
3. Selhání fertilizace ve skupině neoplozených oocytů bylo patrně v důsledku nepřiměřené zralosti oocytů, značná část selhání byla způsobena sníženou kvalitou spermií.



Obr.6: Spermie bez zjevných anomálií. Hlavička s intaktním akrozomem ( →), kondenzovaný jaderný chromatin (N), střední oddíl (SO). Foto: Sedláčková, zvětšení 15 300 x

### **Závěr:**

Na základě rozsáhlého a podrobného studia ultrastruktury buněk cumulus oophorus a spermií ve vzorcích obsažených, jsme se přesvědčili, že náš kultivační systém má vyhovující podmínky pro úspěšnou kultivaci gamet a embryí.

### **1.2. Prodloužená kultivace embryí metodou kokultivace**

Za klasickou kultivaci považujeme dobu 48 až 50 hodin od oplození oocytů, kdy vyvíjející se embrya dosahují stádia 2 až 4 buněk. V tomto stádiu ještě nejsme schopni rozlišit embrya s lepší nebo horší schopností se dále vyvíjet, neboť aktivace embryonálního genomu nastává ve fázi 6 až 8 buněk. Kultivační média dostupná v 90. letech 20. století svým složením neposkytovala



embryím podmínky pro dlouhodobější vývoj, proto byla transferovaná v maximálně 4 buněčném stádiu.

Jako první v České republice jsme na našem pracovišti hledali způsob, jak optimalizovat kultivační prostředí, abychom mohli prodloužit délku kultivace. V dosažení embryí vyšších vývojových stádií jsme viděli potenciál, jak zvýšit úspěšnost programu IVF.

V letech 1994 až 1995 jsme řešili grantový úkol **IGA MZ ČR č. 1820-2 “Optimalizace in vitro fertilizace kokultivací embryí s lidskými tubárními epitelii”** [108]. Vyšli jsme ze zahraničních prací, kdy embrya kultivovali společně se somatickými buňkami. Tento způsob prodloužení délky kultivace embryí byl nazván jako **kokultivace**.

Kokultivace embryí v klinické IVF byly založeny na přijetí postulátů, že běžně používaná média byla suboptimální pro humánní preimplantační embryogenezi, a že monolayer buněk může vytvářet podobné biochemické a biofyzikální podmínky jaké má embryo ve vejcovodu a v děloze. Kulturou somatických buněk mohou být vytvářeny embryotrofické faktory, které pomáhají embryogenezi in vitro a buňky mohou detoxifikovat médium tím, že odstraňují kationty těžkých kovů nebo metabolické inhibitory.

Kokultivace byly nejprve prováděny u zvířat [27, 67, 81]. Pro kokultivace byly testovány různé druhy monovrstev, např. luteinizované granulózní buňky [73], kožní fibroblasty [115], lidské ovidukální buňky [9], opičí Vero buňky [58] a další.

Na našem pracovišti jsme pro kokultivaci s embryi zvolili lidské tubární epitelie. Jejich získávání, výběr dárkyň, příprava monovrstvy a první výsledky jsou popsány v pracích Žákové [119] a Ventruby [105, 109]. Vycházeli jsme z předpokladu, že podmínky vývoje embrya při kultivaci na tubárních epitelích by měly být ze všech systémů nejoptimálnější, neboť buňky budou svým metabolismem a sekrecí příznivě ovlivňovat časná embrya, jako kdyby procházela tubou in vivo.

Téma je zpracováno v **Publikaci III a Publikaci IV**.

### **Materiál a metodika:**

Příprava tkáňové kultury znamenala samostatnou přídatnou, časově náročnou technologii. S její přípravou jsme začali na podzim 1993 a využívání kokultivací v klinické praxi bylo započato v březnu 1994. V toto období bylo nutné stanovit postup při výběru a vyšetření dárkyň



a zvládnout techniku odběru materiálu. Přípravu primokultury tubárních epitelíí (obr. 7) z vejcovodů získaných při hysterektomiích, subkultivaci tubárních epitelíí a kontrolu kvality pro nás zajišťovali pracovníci Biologického ústavu LF MU Brno.

Kritéria pro výběr dáreků:

- preklimakterium
- absence zánětu nebo neoprocesu v organismu
- negativní serologické vyšetření na HIV I, II, HBsAg, HCV, BWR, ALT
- dobrý zdravotní stav
- zopakování serologie po 6 měsících od prvního odběru

Příprava monolayeru:

Tubární epitelie byly z vejcovodu získány mechanickým zpracováním a trypsinizací. Buňky byly nasazeny do kultivačních lahví a kultivovány při 37°C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> ve vzduchu po dobu 4 až 6 dnů do vytvoření primární kultury. Druhá pasáž byla získána trypsinizací primární kultury. Namnožené buňky byly zamrazeny a uchovány do opakovaného serologického vyšetření. Teprve po půl roce od prvního odběru, po negativních serologických výsledcích dáreků, byly buňky použity k vytvoření monolayerů pro kultivaci.

Kultivace gamet a embryí:

V embryologické laboratoři jsme na Petriho misky s připravenou monovrstvou a Earlovým médiem (Serva) přenesli zygoty (24 hodin po odběru oocytů). Kokultivace probíhala dále buď 48 hodin (celkem 72 hodin) nebo 72 hodin (celkem 96 hodin).

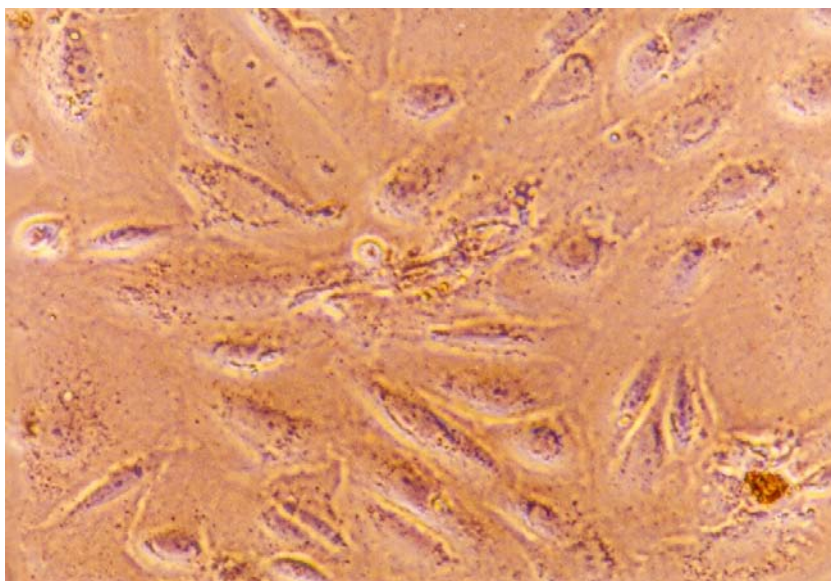
**Výsledky:**

1. Přípravu buněk na kokultivaci a kokultivace embryí s lidskými ovidukálními buňkami jsme prováděli od konce roku 1993 do února 1996.
2. V roce 1995 jsme publikovali počáteční soubor s kokultivací u 14 pacientek.  
Více než 8 buněčného stádia dosáhlo 64,6 % embryí, byla dosažena 4 těhotenství, což činilo 28,6 % klinických gravidit/ET, tj. 28,6 % pregnancy rate (PR).
3. Výsledky většího souboru, které jsme publikovali v roce 1996 uvádějí 104 pacientek s embryi po kokultivaci. Ze získaných 482 oocytů se více než polovina (53,1 %) embryí

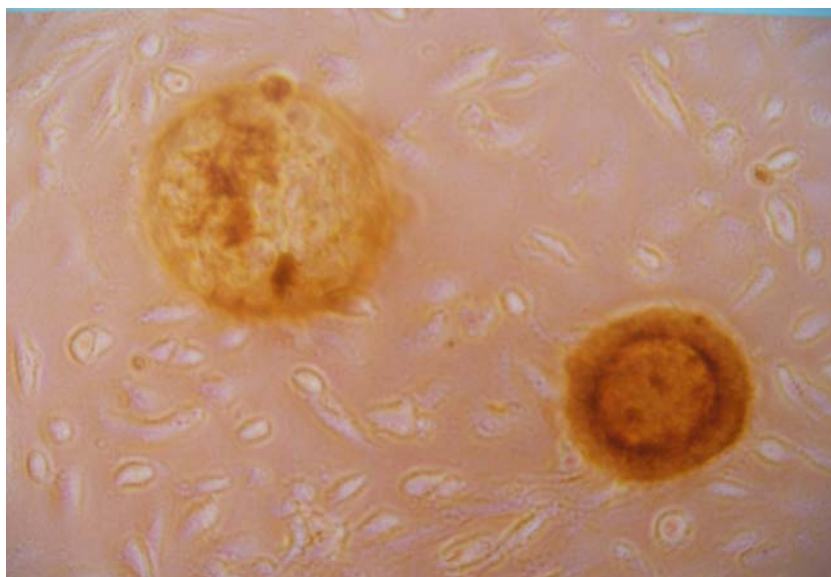
vyvinula do více než 8 buněčného stádia. U 76 žen s provedeným embryotransferem bylo dosaženo 15 klinických těhotenství, tj. 19,4 % PR.

4. Poprvé jsme technikou prodloužené kultivace dosáhli in vitro **stádia blastocysty** (obr. 8).

5. První **porod po transferu tří embryí** ve stádiu moruly proběhl v roce **1994**.



Obr. 7: Monovrstva tubárních epitelíí, zvětšení: 400 x



Obr. 8: Blastocysta a neoplozený oocyt na na monovrstvě tubárních epitelíí, zvětšení: 250 x

## **Závěr:**

Prokázali jsme příznivý vliv prodloužené kultivace na vývoj embryí in vitro. Embrya dosahovala vývojových stádií 8 a více buněk, moruly a blastocysty s dobrou morfologickou kvalitou. Metoda kokultivace byla v té době prvním možným řešením jak prodloužit dobu kultivace embryí in vitro až do 120 hodin.

### **1.3. Média pro prodlouženou kultivaci embryí**

Naše pracoviště bylo jedním z prvních center asistované reprodukce na světě, které začalo využívat v roce 1994 pro prodlouženou kultivaci i plně definovaného syntetického média. Jednalo se o první komerčně dostupné médium M3 – Day 3 medium dánské firmy Medi-Cult [105].

Zavedení do praxe takových médií, která lépe odpovídala potřebám vyvíjejícího se embrya, umožnily studie fyziologických podmínek ženského reprodukčního traktu. Pro optimální fertilizaci jsou doporučena média s vyšším obsahem glukózy, která napomáhají kapacitaci spermií. Avšak časně embryo před dosažením 8 buněk má nízkou metabolickou aktivitu, má omezenou kapacitu využívat glukózu, proto jako zdroj energie slouží pyruvát a laktát. Dělení buněk je stimulováno neesenciálními aminokyselinami. Na rozdíl embryo více než 8 buněčné má vysokou metabolickou aktivitu, využívá glukózu a k proliferaci a diferenciaci buněk vyžaduje neesenciální i esenciální aminokyseliny a vitamíny [28]. Jak se embryo vyvíjí, jeho požadavky na složení média se mění, proto jsou používána tato sekvenční média, která imitují fyzikální a chemické podmínky in vivo prostředí.

Kultivace v prvním komerčně dostupném syntetickém médiu pro prodlouženou kultivaci a její výsledky jsou uvedeny v **Publikaci IV**.

### **Materiál a metodika:**

Fertilizace oocytů probíhala v klasickém médiu. Za 18 až 20 hodin po přidání spermií k oocytům jsme mechanicky odstranili buňky cumulus oophorus a zjišťovali, zda došlo k oplození. Vzniklé zygoty jsme poté přenesly do čerstvého kultivačního média, ve kterém byly kultivovány dalších 24 hodin. K přeložení rýhujících se embryí do média M3 jsme přistoupili ve stádiu 2 nebo 4 buněk. Dřívější použití nebylo vhodné, neboť M3 médium neobsahovalo látky potřebné pro gamety a vývoj zygot. V M3 médiu, které podpořilo embrya k dalšímu dělení a diferenciaci, se embrya ponechala vyvíjet 24 až 48 hodin do doby transferu.

### **Výsledky:**

1. Počáteční soubor publikovaný v roce 1995 zahrnoval 39 pacientek, ve kterém 48,2 % embryí dosáhlo více než 8 buněčného stádia. Bylo dosaženo 11 těhotenství, tj. 28,2 % klinických těhotenství/embryotransfer (PR).
2. Větší soubor z roku 1996 zahrnoval 249 pacientek s prodlouženou kultivací v M3 médiu. Více než 8 buněčného stádia dosáhlo 49,2 % embryí a bylo dosaženo 22,6 % PR. V kontrolním souboru 250 pacientek, u kterých proběhla ve stejném období pouze klasická 48 hodinová kultivace, bylo dosaženo výsledku 16,4 % PR.
3. V současné době je prodloužená kultivace prováděna u 98,5 % klientů našeho programu.
4. Jsou používána syntetická média (Origio, Vitrolife, COOK).
5. V současné době provádíme 90 % embryotransferů 4. den kultivace (12 buněčné stádium až morula).  
10 % embryotransferů provádíme 3. den kultivace (6ti až 8-buněčné stádium) nebo 5. den kultivace (ve stádiu blastocysty) – viz. obr. 9.

### **Závěr:**

Obě metodiky prodloužené kultivace výrazně zvýšily efektivitu programu AR oproti klasické 48 hodinové kultivaci. Prokázali jsme příznivý vliv prodloužené kultivace na vývoj embryí in vitro, kdy embrya dosahovala více než 4 buněčného stádia a vyšší morfologické kvality než při klasické kultivaci. **Prvního embrya ve stádiu blastocysty jsme dosáhli v roce 1995.**

Přestože obě metodiky byly plně srovnatelné v kvalitě a procentu dosahovaných těhotenství, postupně jsme kokultivace opustili, hlavně pro náročnost jejich přípravy. Prodloužená **kultivace v syntetických médiích se stala naší každodenní praxí.**

Postupem doby jsou na trhu dostupné stále kvalitnější modifikace. Např. médium Embryo Assist pro stádia 4 - 8 buněk bylo následováno Blast Assist od 8 buněk do stádia blastocysty nebo ISM1 od 2 do 8 buněk a ISM 2 pro kultivaci do blastocysty (Medi-Cult, Dánsko).

## KLASICKÁ KULTIVACE



zygota

2 bb embryo

4 bb embryo

## PRODLOUŽENÁ KULTIVACE



8 bb embryo

morula

blastocysta

Obr. 9: Stádia embryí při klasické a prodloužené kultivaci

# **PUBLIKACE I**



# MORFOLOGIE BUNĚK CUMULUS OOPHORUS Z KOMPLEXU OOCYT-CUMULUS PO OPLOZENÍ LIDSKÝCH OOCYTU IN VITRO

## *Morphology of the Cumulus Oophorus Cells from the Oocyte - Cumulus Complexes after In Vitro Fertilization of Human Oocytes*

J. Žáková, M. Sedláčková, P. Trávník, P. Ventruba

I. gyn. - por. klinika LF MU, Brno, přednosta doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.

*The ultrastructure of cumulus oophorus cells obtained from the oocyte-cumulus complexes from 14 patients was studied.*

*Materials and methods. Oocyte surrounding mass of cells was removed from oocyte about 20 hrs after in vitro insemination and was processed for transmission electron microscopy. The samples of cumular cells were divided into three groups by the next development of oocytes. I - 6, II - 5 and III - 5 samples.*

*Results. Group I - unfertilized oocytes - heterogeneity of the cytoplasm density (bright, dark) and cumulus cell morphology was found. The bright cells contained high number of organelles what gave evidence about their high metabolic activity. At the dark cells some marks of the beginning of the degeneration were found (more lipid inclusions, residual bodies). In this group higher number of morphology defect sperms occurred.*

*Group II - fertilized oocytes, without implantation - one part of samples had similar ultrastructure to group I with great heterogeneity. The cells in the other part were uniform, similar to group III.*

*Group III - fertilized oocytes, with pregnancy - in this group cells with the greatest uniformity were found. Largely bright cells without any marks of the beginning of degeneration were present.*

*Conclusion. On the basis of the morphological study it is possible to conclude: 1) our cultivation conditions are good, 2) fertilization failure was caused, partly by the oocyte immaturity or overmaturity (this was reflected by the high cumulus cells heterogeneity), 3) partly by the low sperm quality and 4) it is not possible to evaluate the embryotransfer failure only on the basis of morphological findings.*

V průběhu kultivace při in vitro fertilizaci jsou kumulární buňky obklopující oocyt odstraňovány s cílem zjistit, zda oplození bylo či nebylo úspěšné. Struktura kumulárních buněk a jejich další osud nebývají dále sledovány.

Existují práce, které jsou věnovány studiu aktivity lidských kumulárních buněk v sekreci hormonů [2, 3, 16, 17]. Jiné studie se zabývají strukturou buněk ve vztahu k oplodnitelnosti oocytu na světelně [7] nebo elektronově [9, 15] mikroskopické úrovni. Práce autorů Notola a spol. (1991) si všímá podrobně ultrastruktury buněk lidských kumulů před a po kultivaci pouze oocytů u kterých nedošlo k oplození, nebo došlo k polyspermii [11].

V rámci řešení grantového úkolu MZ ČR č. 2703 - 2 jsme se zabývali studiem ultrastruktury kumulárních buněk po jejich společné kultivaci s lid-

ským oocyt. Jedním z cílů bylo zhodnocení kvality kultivačních podmínek na základě posouzení ultrastruktury buněk cumulus oophorus. Dalším cílem bylo detailní vyhodnocení ultrastruktury buněk a jejich analýzou se snažit určit možné příčiny selhání oplození, případně embryotransferu.

### **Materiál a metodika**

Komplexy kumulů - oocyt pocházely od pacientek z programu asistované reprodukce I. gynek. porod. kliniky LF MU v Brně. Oocyty byly získány transvaginální punkcí folikulů pod kontrolou ultrazvuku. Kultivovány byly v Earlově médiu (Serva) v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 37° C (kultivační box Heraeus). Buňky kumulů byly získány 20 hodin po inseminaci in vitro, mechanickým oddělením od oocytů. Byly fixovány glutaraldehydem s přídavkem kyseliny tříslové a postfixovány osmiumtetroxidem a uranylacetátem. Po odvodnění vzestupnou řadou alkoholů byly zality do Durcupanu ACM. Kontrastované ultratenké řezy byly fotografovány v elektronovém mikroskopu Tesla BS 500.

Na základě výsledků oplození a dalšího vývoje oocytu byl získaný materiál rozdělen do 3 skupin: **Soubor I** - folikulární buňky od neoplozených oocytů

**Soubor II** - buňky od oplozených a rýhujících se oocytů, když po jejich transferu nedošlo k implantaci **Soubor III** - kumulární buňky oocytů, které se rýhovaly a po jejichž transferu bylo dosaženo gravidity.

Získaný materiál obsahoval kromě shluků kumulárních buněk různý počet spermií, vláknitý materiál, různé množství buněčného detritu, ojedinělé erytrocyty. Struktura buněk i spermií byla velmi dobře zachována.

Grant byl schválen etickou komisí ústavu.

### **Výsledky**

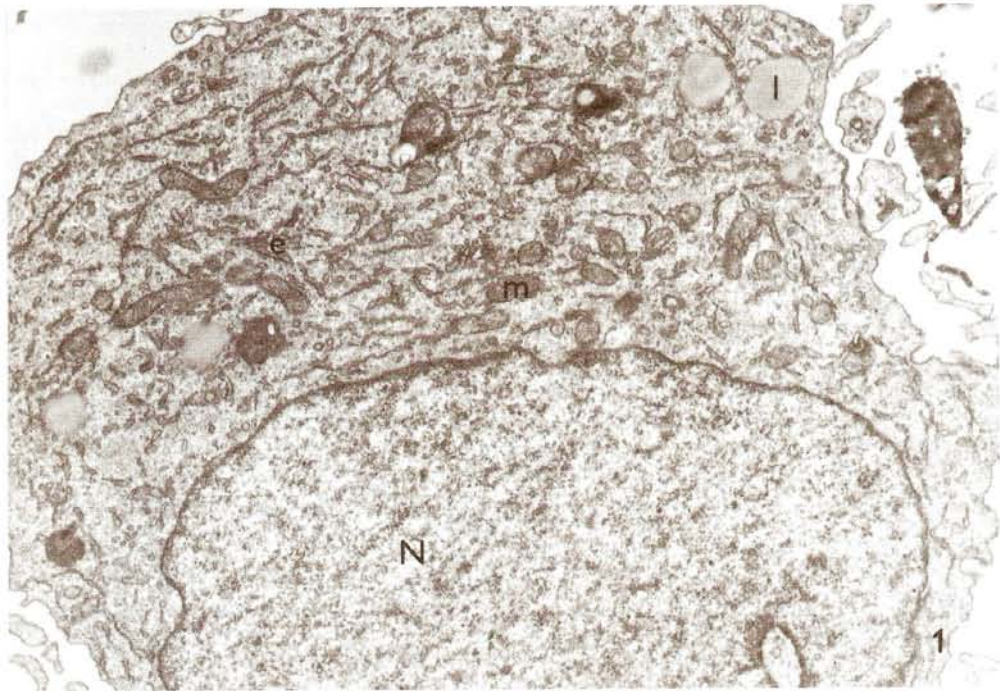
#### **1. Kumulární buňky od neoplozených oocytů (soubor I)**

Bylo zpracováno 6 vzorků od 5 pacientek.

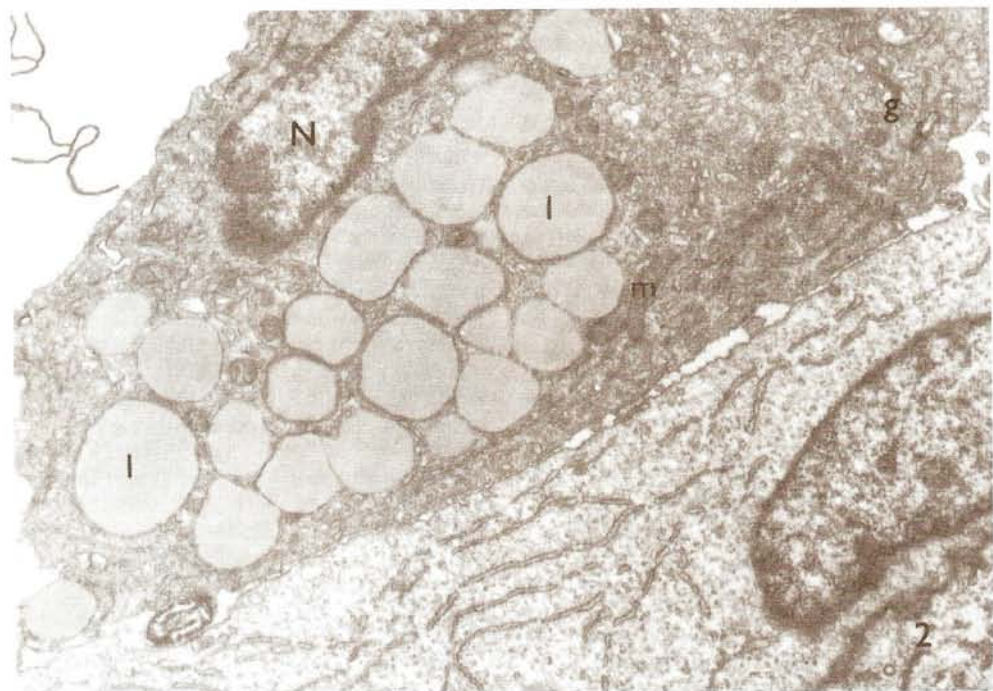
**1.1. Popis buněk.** Tvar buněk byl nepravidelný s početnými kratšími nebo delšími tenkými výběžky. Mezi buňkami byly pozorovány krátké lineární gap junctions. Anulární gap junctions svědčící o expanzi buněk cumulus oophorus, která doprovází maturaci oocytu byly pozorovány u 3 vzorků.

Buňky se vyznačují různou denzitou cytoplasmy, podle čehož je lze rozdělit na světlé (obr. 1)





**Obr. 1.** Část světlé buňky cumulus oophorus. Jádro s velmi jemně rozptýleným chromatinem (N), četné mitochondrie (m), granulární endoplasmatické retikulum (e), lipidové inkluze (l). Zvětšení 18 000x. (Foto: Sedláčková)



**Obr. 2.** Části tmavé a světlé buňky cumulus oophorus. Zřetelný rozdíl v densitě základní cytoplasmy, početné lipidové inkluze (l) v tmavé buňce, část jádra (N), mitochondrie (m), Golgiho aparát (g). Zvětšení 20 000x (Foto: Sedláčková)



a tmavé (obr. 2). Zastoupení obou typů se v jednotlivých vzorcích liší. Světlych buněk je obvykle více (65 - 80 %), v jednom případě převažovaly tmavé buňky (60 %). Většina tmavých buněk má velmi dobře zachovalou strukturu, menší část však vykazuje určité známky porušené struktury, tyto jsou pak menší velikosti. Kromě denzity cytoplasmy se tmavé a světlé buňky liší i svým charakterem.

Jádra světlych buněk jsou převážně oválná. Jádra tmavých buněk mají méně pravidelný tvar. Chromatin je u obou typů buněk jemně rozptýlený s výraznějším nakupením kolem jaderného obalu, v jádrech bývají přítomna 1 - 2 jadérka s nukleolonematomy. Mitochondrie tyčinkovitého tvaru obsahují většinou krystaly a jsou o něco početnější ve světlych buňkách. Golgiho aparát je ve světlych buňkách častěji zastoupen než v buňkách tmavých. Cisterny granulárního endoplazmatického retikula (ER) jsou početné v obou typech buněk, stejně jako volné ribozomy. Hladké ER v podobě drobných váčků nepravidelného tvaru se vyskytuje častěji ve světlych buňkách. Autofagické vakuoly jsou málo početné v obou typech buněk. Reziduální tělíska v podobě koncentricky vrstvených membrán se téměř nevyskytují ve světlych buňkách, ale jsou početná v buňkách tmavých, kde někdy zasahují i do lipidových kapek.

Lipidové inkluze se vyznačují nízkou elektronovou denzitou a dosahují 1  $\mu\text{m}$  v průměru. Ve světlych buňkách je jich obvykle méně (2 - 10 inkluzí na řezu buňkou), v tmavých více (15 - 20 inkluzí, v jednom případě 75). U 3 vzorků bylo v cytoplasmě tmavých buněk nalezeno nahromadění glykogenu. U žádného vzorku nebyly pozorovány mitózy.

**1.2. Spermie.** Spermie nalezené ve vzorcích byly různé kvality. Jen vzácně se spermie nalézaly uvnitř folikulárních buněk.

## **2. Kumulární buňky od rýhujících se preembryí, bez dosažení gravidity (soubor II)**

Bylo vyšetřeno 5 vzorků od 5 pacientek. V této skupině byla zjištěna největší variabilita v morfologii buněk i v přítomnosti dalších struktur.

**2.1. Popis buněk.** Buňky jsou od sebe odděleny, anulární gap junctions se vyskytovaly v různém počtu. Buňky lze rozlišit na světlé a tmavé, zastoupení světlych buněk kolísá od 40 do 60 %. Charakteristika světlych a tmavých buněk je stejná jako v souboru I. Ve většině tmavých buněk jsou početné lipidové inkluze (až 35 inkluzí na řezu buňkou), obvykle dosahují průměru kolem 1  $\mu\text{m}$ . Masivní nakupení glykogenu bylo zjištěno u dvou vzorků, častěji v tmavých buňkách. U žádného vzorku nebyly nalezeny mitózy.

**2.2. Spermie.** Ve vzorcích se vyskytovaly spermie v různém množství a různé kvality. Spermie uvnitř buněk v jednom případě nebyly zjištěny vůbec, ve dvou případech jen v menším počtu, ve dvou případech pak velmi často. Jeden vzorek z této

skupiny byl kontaminován bakteriemi. V blízkosti bakterií byla rovněž nalezena buňka obsahující fagocytované bakterie v různém stupni natrávení.

## **3. Kumulární buňky souboru III (gravidita po transferu)**

Bylo zpracováno 5 vzorků od 4 pacientek.

**3.1. Popis buněk.** Buňky se navzájem nedotýkají, jsou polyedrické nebo zaoblené s kratšími nebo delšími úzkými výběžky. Delší výběžky se někdy vějířovitě větví, někdy obchvacují spermie. Anulární gap junctions byly nalezeny u všech vzorků.

Rozdíl mezi buňkami tmavšími a světlejšími není příliš nápadný a mají stejnou charakteristiku jako ve skupině I a II. Tmavých buněk je podstatně méně (15 - 20 %). Depozita glykogenu byla nalezena ve velmi malém množství u 3 vzorků v obou typech. U žádného vzorku nebyly pozorovány mitózy.

**3.2. Spermie.** Mezi buňkami byly v jednotlivých vzorcích více nebo méně početné spermie. U jednoho vzorku byly zjištěny spermie v různých fázích degenerace nalézající se uvnitř buněk. U zbývajících vzorků se vyskytovaly spermie ve větším počtu (někdy i více spermií v jedné buňce).

## **Diskuse**

Jedním z cílů práce bylo zhodnocení kvality kultivačních podmínek na základě posouzení ultrastruktury buněk kumulu. Většina nálezů svědčila pro velmi dobrou kvalitu kultivačního prostředí. Většina buněk byla aktivních, obsahujících jádro s jemně rozptýleným chromatinem a bohatě zastoupené orgány. V jednom případě bylo zjištěno (soubor II), že došlo ke kontaminaci bakteriemi i přes dodržování všech zásad aseptiky.

Druhým cílem bylo detailní vyhodnocení ultrastruktury buněk kumulu se zaměřením na rozdíly mezi jednotlivými skupinami a jejich analýzu se snahou určit možné příčiny selhání oplození, případně transferu. Souhrnné hodnocení vzorků podle skupin je obtížné. Každý kultivovaný komplex představuje samostatný systém, který se v izolovaných podmínkách může různě vyvíjet díky množství působících faktorů. Rozdíly v morfologii buněk jednotlivých vzorků v rámci jedné skupiny byly často větší než mezi skupinami.

Nejmenší variabilita byla zjištěna v souboru III, kde jsou zastoupeny buňky téměř uniformního tvaru vykazující známky počínající luteinizace (za tyto známky bývá považována přítomnost většího množství lipidových inkluzí, hladkého endoplazmatického retikula, výskyt mitochondrií s tubuly [12]). Mezi buněčné kontakty jsou velmi omezeny, pravidelně jsou nalézány anulární gap junctions jako výraz interiorizace mezi buněčnými spojení, buňky mají četné členité výběžky. Známky počínající luteinizace korelují se zjištěním jiných autorů, že buňky kumulu při kultivaci produkují malé množství steroidů, zejména progesteronu, ale i es-



trogenů, jak bylo prokázáno u pokusných zvířat [1, 10, 12, 14] i u člověka [2, 3, 16, 17].

Početné a členité výběžky nalezené v této skupině buněk jsou popisovány u různých živočišných druhů u plně expandovaných kumulů [1, 5, 11] a mají pravděpodobně vztah k receptorům gonadotropinů [5]. Ani u jedné skupiny jsme ve vzorcích nenašli buňky v některé fázi mitózy, přestože např. Gregory a spol. (1994) přisuzuje proliferaci aktivitě buněk kumulu velký význam při prognóze vzniku gravidity. Podle těchto autorů ke graviditě došlo pouze v případech, kdy buňky kumulu vykazovaly při kultivaci proliferaci aktivit.

Značná polymorfie buněk se vyskytovala v souborech I a II (neoplozené oocyty a embrya, která nedala vznik graviditě). V některých vzorcích skupiny I byly často nalézány anomální spermie s morfologickými odchylkami obtížně zjištěnými ve světelném mikroskopu. Nabízí se vysvětlení, že alespoň v některých z těchto případů byla příčinou neúspěšné fertilizace snížená kvalita spermií.

Další část případů souboru I vykazovala přítomnost buněk zřetelně rozlišených na tmavé a světlé. Přes dobře zachovanou strukturu a známky aktivity tmavých buněk se domníváme, že vykazují určité známky počínající degenerace (denznější cytoplazma, kumulace lipidových inkluzí a často i glykogenu, početná reziduální tělíska). Heterogenita buněk kumulu byla popisována jak ve světelném mikroskopu [7], tak na elektronově mikroskopické úrovni [14, 15], přičemž buňky byly rozlišovány na malé (méně aktivní) a velké. V našem případě nebyl pozorován rozdíl ve velikosti buněk, ale v denzitě cytoplazmy a zastoupení organel (tmavé buňky by odpovídaly buňkám, které byly popisovány jako malé). Obsah lipidových inkluzí bývá užíván jako měřítko luteinizace s tím, že příliš vysoká luteinizace odráží přezralost oocytu [7].

Domníváme se, že vysoký obsah lipidových kapek u buněk výrazně méně aktivních spíše indikuje počátek degenerativních změn, zejména při současném výskytu reziduálních tělísek. Přítomnost zřetelně heterogenní populace buněk kumulu s vysokým zastoupením tmavých buněk pak naznačuje sníženou kvalitu, nedozralost či přezralost oocytu.

V souboru II (rýhující se oocyty, bez dosažené gravidity) byly zastoupeny vzorky připomínající soubor III (buňky více uniformní a aktivní) nebo vzorky podobné jako v souboru I (značná heterogenita buněk). Interpretace výsledků je v tomto případě nejobtížnější. Stanovení příčiny neúspěchu při transferu je možné v případě kontaminace bakteriemi, v ostatních případech by objasnění bylo příliš hypotetické.

Problematika buněk kumulu a jejich vztahu k oocytu při kultivaci je stále v centru pozornosti. V další práci bychom chtěli doplnit morfologické nálezy některými histochemickými vyšetřeními

buněk kumulu po kultivaci ve vztahu k oplození oocytu.

#### Závěr

1. Byla potvrzena dobrá kvalita kultivačních podmínek a kultivačního prostředí laboratoře
2. Selhání fertilizace ve skupině neoplozených oocytů je možné částečně vysvětlit jako důsledek nepřiměřené zralosti oocytů. Nezralost nebo přezralost oocytů se promítla v heterogenitě buněk.
3. Značná část selhání fertilizace in vitro byla způsobena sníženou kvalitou spermií.
4. Příčiny neotěhotnění po transferu embrya nelze hodnotit jen na základě morfologických nálezů u kumulárních buněk.

Práce je součástí řešení grantu IGA č. 2703 - 2 MZ ČR.

#### LITERATURA

1. Balboni, G.C., Zecchi, S.: Structural changes of granulosa cells cultured in vitro. *Histochemical, ultrastructural and stereological observations.* *Acta Anat.* 110, 1981, s. 136 - 145.
2. Barami, S.: Increasing progesterone secretion and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity of human cumulus cells and granulosa-lutein cells concurrent with successful fertilization of the corresponding oocyte. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 5 - 6, 1994, s. 299 - 305.
3. Barami, S., Khoury, C.: Effect of cell-planting density on the steroidogenic activity of human cumulus cells. *J. Reprod. Fertil.* 3, 1994, s. 729 - 735.
4. Fetterolf, P.M. et al.: Conditioned medium for human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biol. Reprod.* 2, 1994, s. 184 - 192.
5. Fléchon, J.E. et al.: Cumulus oophorus mucification during resumption of meiosis in the pig. A scanning electron microscope study. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 26, 1986, s. 989 - 998.
6. Gregory, L. et al.: A study of the cumulus corona cell complex in in-vitro fertilization and embryo transfer: a prognostic indicator of the failure of implantation. *Human Reprod.* 7, 1994, s. 1308 - 1317.
7. Leung, P.C.S. et al.: A histochemical study of cumulus cells for assessing quality of preovulatory oocytes. *Fertil. Steril.* 39, 1983, s. 853 - 855.
8. Mansour, R. et al.: Co-culture of human pronucleate oocytes with their cumulus cells. *Human Reprod.* 9, 1994, s. 1727 - 1729.
9. Nayudu, P.L. et al.: An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics. *Human Reprod.* 5, 1989, s. 558 - 567.
10. Nicosia, S.V., Mikhail, G.: Cumuli oophori in tissue culture: hormone production, ultrastructure, and morphometry of early luteinization. *Fertil. Steril.* 26, 1975, s. 427 - 448.
11. Notela, S.A. et al.: The ultrastructure of human cumulus-corona cells at the time of fertilization and early embryogenesis. A scanning and transmission electron microscopic study in an in vitro fertilization program. *Arch. Histol. Cytol.* 54, 1991, s. 145 - 161.
12. Phillips, D.M. et al.: Structure of the cumulus oophorus at the time of fertilization. *Cell Tiss. Res.* 261, 1990, s. 249 - 259.
13. Quinn, P.: Use of coculture with cumulus cells in insemination medium in human in vitro fertilization (IVF). *J. Assist. Reprod. Genet.* 5, 1994, s. 270 - 277.
14. Rao, I.M. et al.: Heterogeneity in granulosa cells of developing rat follicles. *Anat. Rec.* 229, 1991, s. 177 - 185.
15. Rotmensch, S. et al.: Ultrastructural characterization of human granulosa cells in stimulated cycles: correlation with oocyte fertilizability. *Fertil. Steril.* 45, 1986, s. 671 - 379.
16. Shutz, D.A., Lopata, A.: The secretion of hormones during the culture of human preimplantation embryos with corona cells. *Fertil. Steril.* 35, 1981, s. 413 - 416.
17. Wiswedel, K.: Granulosa cell metabolism and the assessment of oocyte quality in IVF. *Human Reprod.* 2, 1987, s. 589 - 591.

RNDr. Jana Žáková, Obilní trh 11, 656 77 Brno

## **PUBLIKACE II**



## PŮVODNÍ PRÁCE

# Vliv ultrastruktury spermií na výsledek fertilizace in vitro Influence of Sperm Cell Ultrastructure on the Outcome of in vitro Fertilization

Čes. Gynek.  
62, 1997, č. 1  
s. 3 - 6

J. Žáková, M. Sedláčková, P. Ventruba, P. Trávník

I. gynek.-porod. klinika LF MU, Brno, přednosta doc. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

**S u m m a r y:** The ultrastructure of sperm cells in cumulus oophorus of the human oocyte 20 hrs after in vitro fertilization (IVF) was studied.

**Materials and methods:** Mechanically removed cumular cells were processed for electron microscopy and the spermatozoa deposited in the intracellular spaces as well as those penetrating into follicular cells were evaluated. The samples were divided into three groups. Group I contained cumuli from unfertilized oocytes, group II involved those from fertilized oocytes, but not pregnancy after embryo transfer. Group III was formed by cumuli from fertilized oocytes of patients, where pregnancy had been achieved.

**Results:** In group I numerous anomalies of spermatozoal ultrastructure were found, such as head malformations, incompleting chromatin condensation, large cytoplasmic droplets, etc. In groups II and III, about 70 % normal sperm cells were found.

**Conclusions:** These findings provide evidence of the important role of the morphological quality of spermatozoa in the failure of in vitro fertilization, also in cases where anomalies could not be detected by the usual methods of sperm examination.

This work was supported by Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic - grant No. 2703-2.

Kritické parametry kvality spermií pro fertilizaci in vitro (IVF) jsou stále předmětem diskusí, neboť výsledky běžně užívaných testů vždy neodrážejí skutečnou schopnost spermií oplodnit oocyt.

Jednotlivé parametry se mohou u téhož muže lišit při opakovaném vyšetření v určitém časovém intervalu [14, 15]. Se stoupajícím věkem muže dochází ke zvyšování výskytu spermií s různými anomáliemi [5]. Elektronově mikroskopické vyšetření spermií prokazuje určité procento spermií s morfologickými odchylkami, které nelze stanovit ve světelném mikroskopu a přitom mohou podstatně ovlivňovat fertilizační schopnost spermií [21].

V rámci řešení grantového úkolu MZ ČR č. 2703-2 se zabýváme studiem ultrastruktury buněk cumulus oophorus po jejich společné kultivaci s lidským oocytem. V předkládané práci jsme zaměřili svou pozornost na ultrastrukturu spermií, které se vyskytovaly v kumulech oocytů po fertilizaci in vitro (IVF). Naší snahou bylo porovnání morfologického obrazu spermií s výsledkem fertilizace.

## KLINICKÝ SOUBOR A METODIKA

Oocyty byly získány od pacientek zařazených do programu asistované reprodukce I. gynek.-porod. kliniky LF MU v Brně. Odběr byl proveden transvaginálními punkcemi folikulů pod kontrolou ultrazvuku [19, 20]. Kultivace probíhala v Earlově médiu (Serva) v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 37 °C (kultivační box Heraeus).

Oocyty byly inseminovány spermiemi manžela připravenými standardním způsobem [22, 23].

Materiál pro pozorování, buňky cumulus oophorus obsahující spermie, byl získán mechanicky z komplexu kumulus-oocyt 20 hodin po provedené inseminaci. Pro elektronově mikroskopické vyšetření byly vzorky fixovány glutaraldehydem s přidávkem kyseliny tříslivé, postfixovány oxidem osmičelým a uranylacetátem, poté byly odvodněny vzestupnou řadou alkoholů a zality do Durcupanu ACM. Ultratenké řezy byly kontrastovány uranylacetátem a citranem olovnatým. Pozorování a fotografování bylo prováděno na elektronovém mikroskopu Tesla BS 500.

Na základě úspěšnosti fertilizace in vitro, popřípadě dalšího osudu oplozeného oocytu, byly vzorky kumulárních buněk obsahujících spermie rozděleny do tří skupin. Soubor I zahrnuje kumulární buňky od neoplozených oocytů. Soubor II se skládá z kumulárních buněk od oplozených oocytů, které se dále rýhovaly, avšak nebylo dosaženo těhotenství po embryotransferu. Soubor III je tvořen z kumulárních buněk od oplozených a rýhujících se oocytů pacientek, které po transferu embrya v daném cyklu otěhotněly.

Studovaný materiál je běžným odpadním produktem při fertilizaci in vitro.

## VÝSLEDKY

### 1. Hodnocení souborů

Celkem bylo vyšetřeno 26 vzorků kumulárních buněk se spermiemi. Počet spermií v jednotlivých vzorcích byl různý, většinou 20 až 50 průřezů hlavičkou a dvojná-



sobný počet průřezů bičíkem v jednom pozorovaném vzorku. Byly hodnoceny spermie z mezibuněčných prostorů kumulu i spermie, které penetrovaly do folikulárních buněk. Ultrastruktura buněk i spermií byla dobře zachována, což svědčí o dobré kvalitě kultivačních podmínek.

V souboru I (10 vzorků), kde nedošlo k oplození oocytů, byly atypické formy spermií velmi častým nálezem a jen menší počet spermií vykazoval normální morfologii. Šlo většinou o anomálie, které nemohly být zjištěny běžným vyšetřením ve světelném mikroskopu.

V souborech II a III (11 a 5 vzorků), tedy v případech, kde došlo k oplození, byly ve vzorcích nalézány většinou spermie typické stavby (okolo 70 %) a jen menší množství spermií s různými malformacemi.

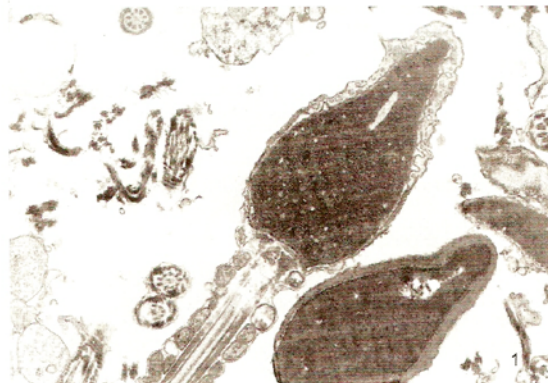
## 2. Ultrastruktura spermií

Abnormality v morfologii spermií byly zjištěny jak v oblasti hlavičky, tak v oblasti středního oddílu a bičíku.

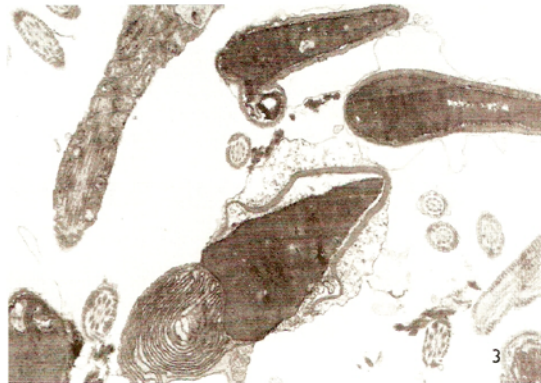
**2.1. Hlavička.** V oblasti hlavičky byl častým nálezem neúplně kondenzovaný chromatin a poruchy vývoje akrosomu. Nedostatečná kondenzace chromatinu byla různě

stupně, od jemnější zrnité struktury až po hrubá chromatinová granula. V jádrech spermií se často vyskytovaly vakuoly a inkluze různého materiálu, především koncentricky uspořádaných membrán, které v některých případech deformovaly tvar hlavičky. Některé vzorky obsahovaly vysoký počet spermií s kulatou hlavičkou. Poruchy vývoje akrosomu se projevily výskytem izolovaných váčků nebo značně nepravidelných útvarů s obsahem o různé elektronové densitě. V některých případech hlavička úplně chyběla a místo ní byla vytvořena cytoplazmatická kapka se silně denzní cytoplazmou obsahující množství váčků a koncentrických membrán.

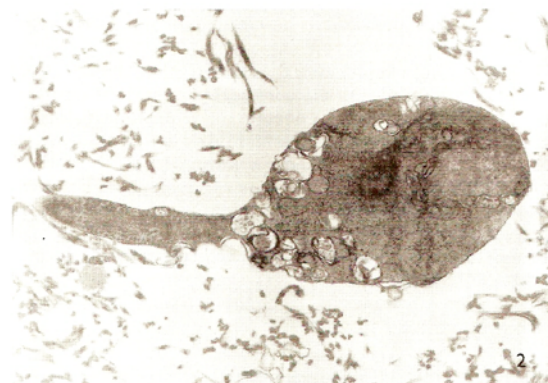
**2.2. Střední oddíl.** Často byly pozorovány spermie s cytoplazmatickou kapkou, tj. zvětšeným objemem cytoplazmy v oblasti krčku nebo středního oddílu. Cytoplazmatická kapka obsahovala kromě útvarů typických pro tuto oblast také nepravidelně distribuované organelly (mitochondrie a váčky různého tvaru) a především soustavy velmi komplikovaně uspořádaných membrán vyběhajících z jaderného obalu. Tento jev bývá spojen s výskytem vícečetných bičků, které mívají chybně vyvinutý axonemální komplex.



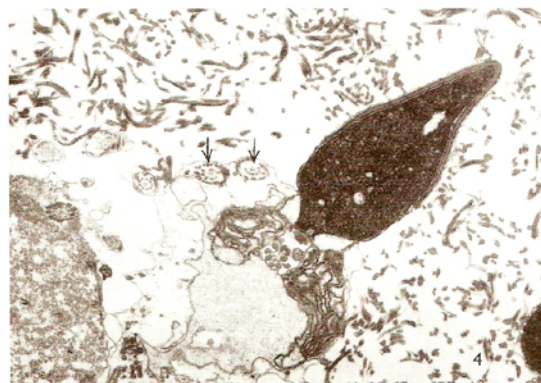
**Obr. 1.** Část spermie s poruchou akrosomu a mírnou formou dekonkondenzace chromatinu. (Foto: M. Sedláčková - orig. zvětšen 13 000krát.)



**Obr. 3.** Část spermie s koncentricky uspořádanými membránami vyběhajícími z jaderného obalu do oblasti krčku. (Foto: M. Sedláčková - orig. zvětšen 12 000krát.)



**Obr. 2.** Část spermie, které chybí jádro. Rozšířená cytoplazmatická kapka obsahující četné membránové struktury imituje tvar hlavičky. (Foto: M. Sedláčková - orig. zvětšen 15 000krát.)



**Obr. 4.** Část spermie s velkou cytoplazmatickou kapkou obsahující membrány a váčky. Abnormálně umístěné průřezy několika osovými vlákny bičíku, dekonkondenzovaným chromatinem a intaktním akrosomem. (Foto: M. Sedláčková - orig. zvětšen 12 000krát.)



2.3. *Bičtěk*. Anomálie bičtěk spočívaly ve výskytu vícečetných bičtěk nebo byly pozorovány méně nápadné poruchy osového vlákna. Šlo o neúplný nebo zvýšený počet dvojic mikrotubulů, popřípadě o bičtěk se zdvojeným osovým vláknem. Různé anomálie se obvykle nevyskytovaly jednotlivě, ale byly sdružené v kombinacích.

### 3. Akrosomální reakce

Dále jsme sledovali četnost spermií s proběhlou akrosomální reakcí a spermií s intaktním akrosomem. Největší výskyt spermií s intaktním akrosomem byl v souboru I, oproti tomu největší výskyt spermií s proběhlou akrosomální reakcí byl u souboru II (tab. 1).

Tab. 1. Zastoupení spermií s intaktním akrosomem a proběhlou akrosomální reakcí.

	Spermie	
	intaktní akrosom	akrosomální reakce
soubor I	70 %	30 %
soubor II	25 %	75 %
soubor III	40 %	60 %

## DISKUSE

Úspěšnost oplození *in vitro* závisí na mnoha faktorech. Při vhodných kultivačních podmínkách závisí výsledek jak na zralosti a kvalitě oocyty, tak na kvalitě spermií. Mnoho neúspěchů IVF je způsobeno předčasným přidáním spermií k meioticky nezralým oocytům, neboť v zona pellucida probíhají důležité maturationální změny během přechodu z metafáze I do metafáze II [18]. Podstatně vyšší počet malformovaných spermií zjištěný v našem materiálu ve skupině, kde nebylo dosaženo oplození oocyty, svědčí o významné roli kvality spermií v selhání fertilizace *in vitro*. Většinu popisovaných anomálií nelze zjistit ve světelném mikroskopu a přitom jde o poruchy, které podstatně ovlivňují vlastnosti spermií. Anomálie v oblasti hlavičky mají přímý vztah k fertilizační schopnosti spermií, anomálie středního oddílu a bičtěk ovlivňují motilitu spermií.

K nejčastěji pozorovaným poruchám patří neúplná kondenzace jaderného chromatinu. Variabilitu ve stupni kondenzace chromatinu vykazují i u fertilních mužů různý počet spermií [2, 3, 12]. Mohlo by jít o vyjádření různého stupně zralosti jako postupné kondenzace chromatinu během spermatogeneze [8] a nálezy by svědčily pro to, že proces kondenzace chromatinu není dovršen ve všech spermiích. Existuje i druhá možnost, že k de-kondenzaci dochází sekundárně jako následek nedostatečné koncentrace zinku ve spermiích [11], neboť zinek pomáhá udržovat chromatin spermií v kondenzovaném stavu [4]. Snížený obsah zinku může mít vztah k případům sterility, kde je poru-

šena sekvence vypuzování sekretů při ejakulaci, ale i při arteficiální inseminaci v některých případech neadekvátní manipulace se spermatem [11].

Často se vyskytující vakuoly v jádru bývají znakem nerovnoměrné kondenzace chromatinu a spolu s nízkým stupněm kondenzace souvisí s chromosomovými abnormalitami [21]. Rovněž poruchy tvaru hlavičky (kulatý tvar) mohou naznačovat snížení fertilizační schopnosti spermií [10] a bývají spojeny s dalšími defekty, zejména akrosomu. Všechny anomálie akrosomu podstatným způsobem ovlivňují fertilizační schopnost spermií a bývají typickým defektem u mužů s dlouhotrvající sterilitou, přestože běžná analýza často ukáže normální počet, pohyblivost i morfologii spermií [21].

V oblasti spojovacího oddílu byly často pozorovány cytoplazmatické kapky, které se mohou objevovat i u spermií fertilních mužů a vykazují poměrně značné objemové variace [17]. V našem materiálu pozorované cytoplazmatické kapky však byly extrémně velké s anomálním uspořádáním struktur, což svědčí o porušení motorického centra spermií [21].

Při inseminaci *in vitro* se neuplatňují některé mechanismy, které působí při inseminaci *in vivo*. *In vivo* probíhá selekce spermií na různých úrovních včetně působení cervikálního hlenu jako důležitého faktoru [9], takže až do blízkosti oocyty se dostanou jen po všech stránkách normální spermie a mezi buňkami kumulu jsou nalézány jen spermie s proběhlou akrosomální reakcí [13]. Protože tento selektivní mechanismus je při inseminaci *in vitro* vynechán, pozorovali jsme ve všech vzorcích určité množství spermií s intaktním akrosomem. Nejvíce jich bylo ve skupině I, kde nedošlo k oplození (70 %), ale poměrně velký počet byl i ve skupině III, kde došlo k oplození i graviditě (40 %). Na druhé straně, v případě snížené pohyblivosti spermií nebo jejich sníženého počtu, může být IVF úspěšnější než inseminace *in vivo* [1, 6], takže je tato metoda používána i v některých andrologických indikacích. Opakovaně neúspěšná fertilizace semenem manžela bývá indikací k užití semene dárce [7]. V současné době mohou tuto situaci řešit mikromanipulační techniky, zejména intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI). V případě neúspěšného oplození *in vitro* může elektronově mikroskopické vyšetření pomoci rozhodnout o dalším postupu. Absolutní indikací k ICSI představují závažné morfologické poruchy lokomočního aparátu spermie.

## ZÁVĚR

Studium ultrastruktury spermií prokázalo, že morfologická kvalita spermií jako jeden z hlavních andrologických faktorů umožní doporučit neplodnému páru optimální metodu asistované reprodukce nebo asistované fertilizace.

## LITERATURA

1. **Aitken, R. J.:** Assessment of sperm function for IVF. *Human Reprod.*, 1, 1988, s. 89-95.
2. **Bedford, J. M.:** Observation on the fine structure of spermatozoa of the Bush Baby (*Galago senegalensis*), the african green monkey (*Cercopithecus aethiops*) and man. *Amer. J. Anat.*, 121, 1967, s. 443-460.
3. **Bedford, J. M., Calvin, H. I., Cooper, G. W.:** The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 18, 1973, s. 199-213.
4. **Bjorndahl, L., Kvist, U.:** Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int. J. Androl.*, 13, 1990, s. 232-237.
5. **Bujan, L., Miesusset, R., Mondinat, Ch. et al.:** Sperm morphology in infertile men and its age related variation. *Andrologia*, 20, 1988, s. 121-128.
6. **Cittadini, E., Guastella, G., Comparetto, G. et al.:** IVF/ET and GIFT in andrology. *Human Reprod.*, 1, 1988, s. 101-104.
7. **Deschacht, J., Devroey, P., Camus, M. et al.:** In vitro fertilization with husband and donor sperm in patients with previous fertilization failures using husband sperm. *Human Reprod.*, 1, 1988, s. 105-108.
8. **Evenson, D. P., Witkin, S. S., de Harven, E. et al.:** Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoa chromatin. *J. Ultrastruct. Rec.*, 63, 1978, s. 178-187.
9. **Fredericsson, B., Bjork, G.:** Morphology of post-coital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil. Steril.*, 28, 1977, s. 841-845.
10. **Katz, D. F., Ocerstreet, J. W., Sanuels, S. J. et al.:** Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J. Androl.*, 7, 1986, s. 203-210.
11. **Kvist, U.:** Sperm nuclear chromatin decondensation ability. *Acta physiol. scand.*, 486, 1980, s. 1-24.
12. **Pedersen, H.:** Ultrastructure of the ejaculated human sperm. *Z. Zellforsch.*, 94, 1969, s. 542-554.
13. **Pereda, J., Coppo, M.:** An electron microscopic study of sperm penetration into the human egg investments. *Anat. Embryol.*, 173, 1985, s. 247-252.
14. **Schrader, S. M., Turner, T. W., Breitenstein, M. J. et al.:** Longitudinal study of semen quality of unexposed workers. *Reprod. Toxicol.*, 2, 1988, s. 183-190.
15. **Schrader, S. M., Turner, T. W., Simon, S. D.:** Longitudinal study of semen quality of unexposed workers: sperm head morphometry. *J. Androl.*, 1, 1990, s. 32-37.
16. **Shanis, B. S., Check, J. H., Bollendorf, A.:** Interpretation and misinterpretation of semen parameters. *Arch. Androl.*, 23, 1989, s. 213-227.
17. **Smith, D. C., Anderson, C. W., Barrat, C. L. R. et al.:** Ultrastructural morphometric data of human spermatozoa. *Andrologia*, 20, 1988, s. 396-403.
18. **Tesařík, J., Pilka, L., Trávník, P.:** Zona pellucida resistance to sperm penetration before the completion of human oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.*, 83, 1988, s. 487-495.
19. **Ventruba, P., Čupr, Z., Pilka, L. et al.:** Transvaginální odběr oocytů pod kontrolou vaginální sonografie 1987 - 1990. *Gynekolog*, 1, 1992, s. 5-7.
20. **Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J. et al.:** Prolonged cultivation of human embryos: coculture on human tubal epithelia versus a synthetic medium. In: IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, 1995, s. 429-433.
21. **Zamboni, L.:** The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil. Steril.*, 48, 1987, s. 731-734.
22. **Žáková, J., Ventruba, P., Pilka, L.:** Koreluje test přežívání spermíí (TPS) s fertilizací oocytu in vitro? *Čs. Gynek.*, 6, 1992, s. 257-260.
23. **Žáková, J., Ventruba, P., Němcová, S.:** Assisted hatching - results in women with repeated embryotransfer failure. In: IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, 1995, s. 539-541.

Projekt byl řešen s finanční podporou IGA MZ ČR reg. č. 2703-2.

RNDr. J. Žáková  
I. gynek.-porod. klinika  
Obilní trh 11  
656 77 Brno

## Profil antifosfolipidových protilátek u různých diagnóz vzájících se k reprodukci

### Profile of Antiphospholipid Antibodies in Different Diagnoses Associated with Reproduction

Z. Ulčová-Gallová, P. Panzner, V. Krauz, P. Fialová  
Gynek.-porod. klinika LF UK, Plzeň, přednosta doc. MUDr. P. Panzner, CSc.

**S u m m a r y:** The authors investigated antiphospholipid antibodies (APA) against phosphatidic acid, ph-ethanolamine, ph-DL-glycerol, ph-inositol, ph-L-serine and cardiolipine in isotypes IgG and IgM in various diagnoses associated with reproduction. They found that the most varied pat-

Čes. Gynek.  
62, 1997, č. 1  
s. 6 - 9

## **PUBLIKACE III**



# KOKULTIVACE EMBRYÍ S BUŇKAMI LIDSKÉHO VEJCOVODU V PROGRAMU ASISTOVANÉ REPRODUKCE NA I. GYNEK. POROD. KLINICE V BRNĚ

*Cocultivation of embryos with Fallopian tube cells in programme of assisted reproduction in 1st gyn.obst. dptm in Brno*

J. Žáková, P. Ventruba, J. Adler, P. Trávník

I. gynek. porod. klinika LF MU, Brno, přednosta doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.

## Summary

*Aim of the study: to evaluate influence of the prolonging culture time when the embryos were cultured in the presence of human oviductal epithelial cells (HOEC).*

*Methods. Monolayers were prepared from HOEC's collected from fallopian tubes which were obtained during hysterectomy in premenopausal viral screened women. Coculture was practiced in the group of 41 women in IVF/ET programme. In 17 cases (group I) pronuclear stage embryos were cocultured on HOE-monolayers for 48 hours (72 hours of the total culture time). In 24 cases (group II) embryos were cocultured for 72 hours (96 hours of the total culture time).*

*Results. Group I - (72 h) at 14 women from 79 zygotes 51 embryos ( 64.6 %) developed into eight and more than eight cells stage. 4 pregnancies were obtained (28.6 % pregnancy rate). In 3 cases the embryos development stopped at 2-cell stage.*

*Group II - (24 women) from 100 zygotes 69 embryos (69.0 %) reached eight and more cells stage. From 21 transfers with good quality embryos were 3 pregnancies achieved (14.3 % pregnancy rate). At 3 women ET with 4-cell poor quality embryos was done.*

*Conclusions. The preparation and using HOE-monolayers in our laboratory improved the quality of human embryos. The pregnancy rate was improved in case 72 hours of the total culture time.*

Jedna z metod, která směřuje ke zvyšování úspěšnosti programu asistované reprodukce, je prodloužení délky kultivace embryí in vitro. Ne všechny oplozené oocyty mají stejný vývojový potenciál. U části embryí se vývoj zastaví na 2-, 4- i vícebuněčném stádiu. Výhoda prodloužené kultivace nad obvyklou hranici 48 - 52 hodin spočívá v možnosti taková embrya vyloučit z další kultivace. To nám umožní transferovat pouze embrya nejlépe se vyvíjející, životaschopná a morfologicky nejkvalitnější. Výhodou je rovněž posunutí přenosu embryí do dělohy na dobu, kdy je děložní prostředí lépe připraveno pro jejich přijetí.

Prodloužit dobu vývoje embryí je možné pomocí společné kultivace, tzv. kokultivace se somatickými buňkami. K tomuto účelu byly testovány různé druhy monovrstev: např. luteinizované granulózové buňky (10), epitelie lidského endometria (11), kožní fibroblasty (14), ovidukální buňky (2, 6, 9, 11, 16), bovinní uterinní fibroblasty (15), opičí Vero buňky (7, 8, 12, 17) a další.

Kokultivace byly nejprve prováděny u zvířat (6, 9, 11). Bongso et al. (2,3) jako první uvádí kokultivaci lidských embryí na lidských tubárních buňkách. V České republice nejsou dosud zkušenosti s kokultivací na tubárních epitelích. Na našem pracovišti jsme se touto problematikou začali zabývat v roce 1993 (18, 19) a od začátku roku 1994 i v rámci grantového úkolu MZ ČR. Vycházeli jsme z předpokladu, že podmínky vývoje embrya při kultivaci na tubárních epitelích in vitro by měly být ze všech kokultivačních systémů neoptimálnější, neboť odpovídají podmínkám, které má embryo v odpovídajícím stádiu při průchodu tubou in vivo.

Cílem úvodní etapy řešení této problematiky bylo zvládnutí techniky přípravy monolayeru lidských tubárních epitelů, vyšetření kvality monolayeru elektronovou mikroskopií, a poté zavedení kokultivace embryí v program IVF/ET.

## Materiál a metodika

### I. Monolayer lidských tubárních epitelů

Příprava monolayerů lidských tubárních epitelů byla zahájena v polovině roku 1993. Výchozím materiálem byly vejcovody získané při hysterektomiích na naší klinice.

1.1. Kritéria pro výběr dárců: (a) preklimakterium, (b) absence zánětu nebo neopcesu v organismu, (c) negativní serologická vyšetření na HIV I, II, HBsAg, HCV, BWR, ALT a (d) dobrý zdravotní stav. Vhodná dárkyně vejcovodu byla písemně i ústně informována o našem záměru a svůj souhlas potvrdila podpisem. Byla rovněž informována o povinnosti zopakovat serologické vyšetření po uplynutí 6 měsíců od prvního odběru.

1.2. Vlastní příprava: tubární epitelie byly z vejcovodu získány mechanickým zpracováním a trypsinizací. Buňky byly nasazeny do kultivačních lahví a kultivovány při 37°C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> ve vzduchu, v médiu Ham F12 po dobu 4 až 6 dnů do vytvoření primární kultury. Druhá pasáž byla získána trypsinizací primární kultury. Namnožené buňky byly zamrazeny v roztoku PBS s 1,5 M DMSO a uchovávány při -150°C do opakovaného serologického vyšetření dárkyně provedeného půl roku od prvního odběru. Teprve poté byly buňky použity pro vytvoření monolayerů pro kultivaci.

### 2. Odběr oocytů a kultivace

Folikulární vývoj byl stimulován gonadotropiny (Pergonal Sero, Humegon Organon) v dávce 150 - 225 IU/den. Stimulace probíhala od 3. dne menstru-



ačního cyklu s monitorováním 17-beta estradiolu (E2), LH a ultrazvukové folikulometrie. Po dosažení adekvátní ovariaální odpovědi byla maturace oocytů indukována 9000 j. lidského choriového gonadotropinu (hCG - Praedyn Spofa, Profasi Serono, Pregnyl Organon). 36 hodin po aplikaci hCG byl proveden folikulocentézou pod kontrolou UZ (13) odběr oocytů. Kultivace probíhala v Earlově médiu (Serva) při 5% CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 37° C v kultivačním boxu (Heraeus). Spermie byly připraveny metodou centrifugace a swim up. Za 17 až 20 hodin po oplozování bylo provedeno odstranění kumulárních buněk a kontrola přítomnosti prvojaderných zygot. Vzniklé zygoty byly přeneseny na monolayer s Earlovým médiem. Společná kultivace probíhala buď 48 hodin (celková doba 72 hodin) - I. skupina, nebo 72 hodin (celková doba 96 hodin) - II. skupina. Transferována byla maximálně 4 embrya.

## Výsledky

### A. Preklinické výsledky

1. První epitelální buňky lidského vejcovodu byly zpracovány a zamrazeny. Od začátku roku 1994 začaly být používány pro přípravu monolayerů (obr. 1).

2. Pro posouzení kvality a vitality tubárních epitelů byla provedena elektronmikroskopická vyšetření monolayerů. Dle získaných výsledků bylo možno potvrdit, že se jedná o kvalitní, vitální epitelie.

### B. Klinické výsledky

Výsledky rýhování a vývoje embryí svědčí o úspěšném zvládnutí metodiky kokultivace a tím překlenutí vývojového bloku v podmínkách kultivace in vitro (obr. 2).

I. soubor (kultivace 72 h): Z celkového počtu 17 pacientek byl u 14 žen (82,4 %) proveden transfer. Ze 79 zygot se 51 embryí (64,6%) vyvinulo do osmi a vícebuněčného stádia. Bylo dosaženo 4 těhotenství (28,6 % klinických gravidit /ET). Ve 3 případech došlo k zastavení vývoje na 2-buněčném stádiu.

II. soubor (kultivace 96 h): U 24 pacientek během kultivace ze 100 zygot dosáhlo 69 embryí (69,0 %) osmi a vícebuněčného stádia. Z 21 transferů s dobrou kvalitou embryí bylo dosaženo 3 těhotenství (14,3 % klinických gravidit/ET). U dalších 3 žen byl transfer prognosticky nepříznivý, neboť embrya po 96 hodinách kultivace dosáhla pouze 4-buněčného stádia, což ovlivnilo snížení celkového počtu dosažených klinic-

kých těhotenství na 12,5 % na provedený embryotransfer.

**Kontrolní soubor** zahrnuje 24 pacientek po sobě jdoucích ve stejném období, u kterých byla provedena klasická kultivace po dobu 48 hodin.

### Diskuse

Řada prací zabývajících se kokultivací u různých živočišných druhů včetně člověka ukázala, že společná kultivace embryí se somatickými buňkami zlepšila jejich vývoj in vitro.

Provádění kokultivací embryí v klinické IVF bylo založeno na přijetí následujících předpokladů: a) běžná syntetická média jsou suboptimální pro humánní preimplantační embryogenezi (8), b) monolayer buněk může vytvářet podobné biochemické a biofyzikální podmínky jaké má embryo ve vejcovodu a v děloze (2), c) kulturou buněk mohou být vytvářeny embryotrofní faktory, které pomáhají embryogenezi in vitro (7), d) somatické buňky mohou detoxikovat médium tím, že odstraňují kationty těžkých kovů nebo metabolické inhibitory, nebo oboje (8).

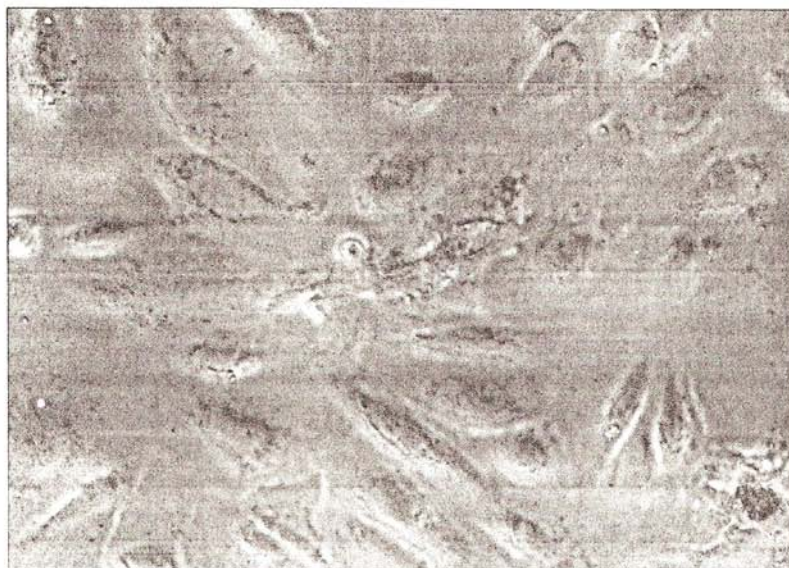
Positivní vliv kokultivace se může projevit zvýšením počtu buněk embrya, zvýšením počtu embryí schopných dosáhnout až stádia blastocysty, lepší morfologickou kvalitou s nižším výskytem fragmentací a /nebo zlepšením životaschopnosti embryí po transferu.

Např. Bongso et al. (2, 3, 4) pozoroval signifikantní zlepšení vývoje embrya do stádia kavitované blastocysty. Nepozoroval však významný vliv na formaci expandované blastocysty, nebo na proces hatchingu blastocyst. Yeung (16) uvádí lepší vývojový potenciál a nižší poměr fragmentace embryí při kokultivaci na lidských ovidukálních buňkách. Uvádí však, že procento hatchingu blastocyst bylo signifikantně vyšší u embryí kokultivovaných (38 %) než u embryí bez kokultivace (7 %).

Naše výsledky při prodloužené kultivaci na monolayeru tubárních epitelů ukázaly, že embrya dosahovala vyšších vývojových stádií s dobrou morfologickou kvalitou. Rovněž procento klinických těhotenství na transfer bylo vyšší, zvláště v případě, kdy celková doba kultivace byla 72 hodin (28,6 %). Při klasické kultivaci dosahujeme 20 procent klinických těhotenství na provedený embryotransfer.

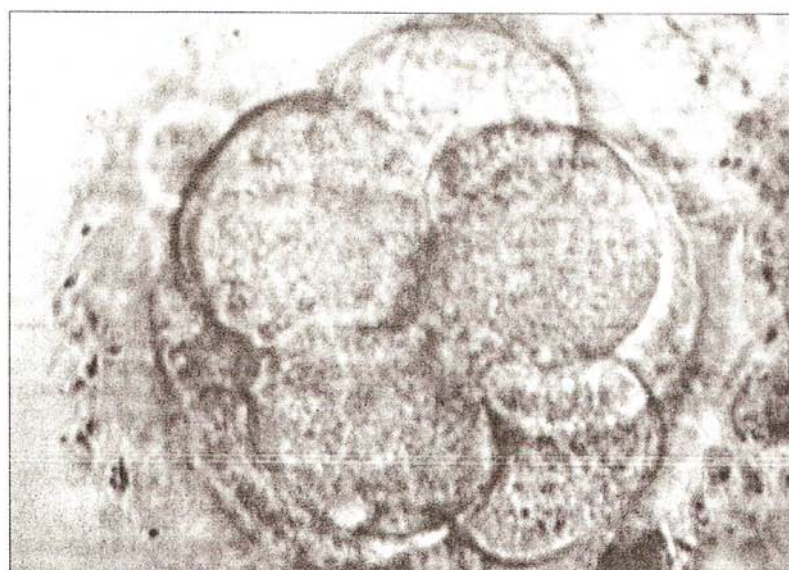
Tab. 1: Výsledky kokultivace embryí na tubárních epitelích

Celková doba kultivace	počet		> 8-bb embrya %	počet grav. n	klinická grav./ ET %
	žen n	ET n			
Soubor I (72 h)	17	14	64,6	4	28,6
Soubor II (96 h)	24	24	69,0	3	12,5
Kontrolní soubor (48 h)	24	10	0	2	20,0



**Obr. 1** Monolayer lidských tubárních epitelii, zvětšeno 700x

(foto: J. Žáková)



**Obr. 2** 8-buněčné embryo po 48 hodinách kokultivace, dobře patrné spermie zachycené v zona pellucida, zvětšeno 900x

(foto: J. Žáková)

Výsledky kokultivace embryí s ovidukálními buňkami hodnotíme jako pozitivní a přínosné pro program asistované reprodukce na našem pracovišti. Přesto je třeba jednak vzhledem k náročnosti přípravy monolayerů a jednak vzhledem k některým rozporupným názorům

na kokultivaci jako takovou (1,5), vzít v úvahu i jinou možnost prodloužené kultivace. Jedná se o použití nových médií, vyvinutých pro tento účel. Předmětem naší další práce bude srovnávání výsledků z prodloužené kultivace na monolayeru lidských tubárních epitelii



svýsledky prodloužené kultivace v komerčně vyráběném médiu.

Práce je součástí řešení grantu MZ ČR 1820-2.

#### Literatura

1. **Bavister, B. D.:** Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum. Reprod.*, 10, 1992, s. 1339 - 1341. 2. **Bongso, A., Sathananthan, H., Ng, P. L., Rauff, M. and Ratnam, S.:** Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum. Reprod.*, 4, 1989 a, s. 706 - 713. 3. **Bongso, A., Ng, S. C., Sathananthan, Ng, P. L., Rauff, M. and Ratnam, S.:** Establishment of human ampullary cell cultures. *Hum. Reprod.*, 4, 1989 b, s. 486 - 494. 4. **Bongso, A., Fong, C. Y., Ratnam, S.:** Co-cultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil. Steril.*, 56, 1991, s. 179 - 191. 5. **Bongso, A., Fong, C. H., Ng, S. and Ratnam, S.:** The search for improved in-vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 1155 - 1162. 6. **Gandolfi, F. and Moor, R. M.:** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.*, 81, 1987, s. 23 - 28. 7. **Menezo, Y., Guerin, J. F. and Czyba, J. C.:** Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of Vero cells. *Biol. Reprod.*, 42, 1990, s. 301 - 306. 8. **Menezo, Y., Hazout, A., Dumont, M., Herbaut, N., Nicolle, B.:** Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum. Reprod.*, 7, 1992, Suppl. 1, s. 101 - 106. 9. **Ouhibi, N., Menezo, Y., Benet, G. and Nicolle, B.:** Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum. Reprod.*, 4, 1989, s. 229 - 235. 10. **Plachot, M., Antoine, J. M., Alvarez, S., Firmin, C., Pfister, A., Mandelbaum, J., Junca, A. and Salat-Baroux, J.:** Granulosa cells improve human embryo de-

velopment in vitro. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 2133 - 2140. 11. **Sakkas, D. and Trounson, A. O.:** Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 1990, s. 109 - 118. 12. **Schillaci, R., Criminna, R., Cefalu, E.:** Vero cell effect on in vitro human blastocyst development: preliminary results. *Hum. Reprod.*, 6, 1994, s. 1131 - 1135. 13. **Ventruba, P., Cupr, Z., Pilka, L., Žáková, J.:** Transvaginální odběr oocytu pod kontrolou vaginální sonografie: 1987 - 1990. *Gynekolog*, 1, 1992, s. 5 - 7. 14. **Wetzels, A. M., Punt, A. P., Van der Zalm, Bastlaans B. A., Janssen B. A., Goverde H. J., Rolland R.:** The effects of human skin fibroblast monolayers on human sperm motility and mouse zygote development. *Hum. Reprod.*, 7, 1992, s. 852 - 856. 15. **Wiemer, K. E., Cohen, J., Wiker, S.R., Malter, H.E., Wright, G. and Godke, R.A.:** Co-culture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil. Steril.*, 52, 1989, s. 503 - 508. 16. **Yeung, W.S.B., Ho, P.C., Lau, E.Y.L., Chan, S.T.H.:** Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum. Reprod.*, 7, 1992, s. 1144 - 1149. 17. **Zetová, L., Mardešič, T., Míková, M., Müller, P., Stroufová, A.:** Improved Development of Human Embryos Cultured on a Vero Cell Monolayer. *J. Assist. Reprod. and Genet.*, 10, 1993, s. 234 - 236. 18. **Adler, J., Komárková, J., Ventruba, P., Trávník, P., Žáková, J.:** Kultivace embryí s lidskými tubárními epitelii. Abstr. III. Symposia asist. reprodu., Brno, 1993, s. 14. 19. **Žáková, J., Adler, J., Ventruba, P., Trávník, P., Komárková, J.:** Human oviductal epithelia co-culture system for IVF. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, Suppl. 4, s. 163 (Abstracts of the 10th Annual Meeting of the ESHRE, Brussel, 1994).

RNDr. Jana Žáková, I. gyn.- por. kl. LF MU, Obilní trh II, 656 77 Brno

## CO NOVÉHO PŘINÁŠÍ TROJITÝ SCREENING - TRIPLE TEST?

*What new screening triple test brings?*

Z. Malý

Por.- gyn. klinika MU, FN Brno-Bohunice, přednosta Doc. MUDr. Jiří Kopečný, CSc.

Současnou praxí je, že amniocenteza (AMC), nebo aspirace choriových klků (CVC) je nabízena, případně doporučována, těhotným starším 35 let. Riziko, že tyto ženy porodí plod postižený chromozomální aberací je zvýšeno a představuje v 35 letech asi 1:270 /13/. S přibývajícím rokem pacientky toto riziko exponenciálně stoupá. Nutno však podotknout, že v souvislosti s věkem těhotných žen se vyskytuje pouze 1,4 % všech trisomií a na sex. chromozomy vázaných aneuploidii /4/. Deutinger /6/ uvádí, že ze 7240 amniocentéz, provedených u žen po 35. roce věku, byla zachycena chromozomální porucha pouze ve 2,5 % případů. V jiho-moravském regionu bylo např. v roce 1994 provedeno 401 AMC z věkové indikace s pozitivním nálezem v 1,7 % /2/. Při věkové hranici, která je indikací pro hledání chromozomálních aberací, je možno zachytit jen asi 20 % skutečně postižených případů. Zbývajících 80 % chromozomálních poruch časné diagnostice uniká, neboť se jedná o děti žen mladších 35 let! Riziko chromozomálních vad u těchto mladších žen leží pod hranicí 1:1000. Amniocenteza, CVS, případně kordocenteza, mají jako invazivní zákroky určitá rizika kom-

plicací /8/ a jejich důsledkem může být i potracení zcela zdravé gravidity. Proto by tyto zákroky měly být prováděny u těhotných se skutečně zvýšeným individuálním rizikem! Trojitý screening - triple test umožňuje nalézt těhotné se zvýšeným rizikem Downova syndromu i mezi ženami mladšími! Přináší možnost výpočtu individuálního rizika, tedy pravděpodobnosti, že těhotná žena porodí dítě s chromozomální vadou (především Down. syndromem) a to NEZÁVISLE na jejím STÁŘÍ. Pro posouzení se užívá tři sérových markerů AFP, hCG a nekonjugovaný estriol E 3 /17/.

### HISTORIE TROJITÉHO SCREENINGU

V roce 1984 Merkatz et al./12/ zveřejnili zjištění, že u 25 % matek s plodem postiženým trisomií 21, byly nezávisle na stáří matky detekovány v průběhu těhotenství snížené hodnoty AFP. Naopak zvýšené hodnoty AFP pozorovali u rozštěpů dorsální (NTD) nebo ventrální stěny trupu, atresii střeva, onemocnění fetálních ledvin (poruchy glomerulární filtrace) a vícečetných těhotenství. Uváděli, že pouhým sledováním nízkého AFP lze zachytit 25-30 % všech trisomií. V roce 1986 Bogart at al./1/ zjistili,

## **PUBLIKACE IV**

---

# **Prodloužená kultivace lidských embryí: srovnání kokultivace na lidských tubárních epiteliích a kultivace v syntetickém médiu**

## **Prolonged Cultivation of Human Embryos: Comparison of Co-cultivation on Human Tubal Epithelia and Cultivation in a Synthetic Medium**

---

**P. Ventruba, J. Žáková, J. Adler, P. Trávník, J. Komárková, S. Němcová**

I. gynek.-porod. klinika LF MU, Brno, přednosta doc. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

Tkáňová banka FN, Brno - Bohunice, vedoucí doc. MUDr. J. Adler, CSc.

Ústav histologie a embryologie LF MU, Brno, přednosta prof. MUDr. D. Horký, DrSc.

---

**Summary:** The aim of this work was to evaluate prolongation of cultivation time of human embryos. The prolongation above the standard limit was implemented (1) by coculture of embryos on a monolayer of human epithelial cells and (2) by using a synthetic medium.

**Material and methods:** Ovarian stimulation, oocyte recovery, insemination and cultivation up to the pronuclear stage were done in our centre in the usual way.

**Group I:** 104 women, prolonged culture by the coculture method. The zygotes were placed on the monolayer and cultivated for an other 24 or 48 hours. **Group II:** 249 women, prolonged culture in

---



a synthetic medium. The zygotes were cultivated up to the 2- to 4-cell stage in standard IVF medium, and then put into M3 medium for the next 24 or 48 hours. A transfer of a maximum of 4 embryos was done.

**Results:** In group I in 104 women from 341 zygotes 181 embryos (53.1 %) reached the eight- and more than eight-cell stage, and 76 transfers were done. 15 pregnancies were achieved (19.4 % pregnancy rate). In group II in 249 patients from 672 embryos 49.7 % of them reached 8- and more than 8-cell stage. 51 pregnancies were achieved (22.6 pregnancy rate). In the control group of 250 IVF after 48 hours cultivation 165 transfers (66.0 %) were done, and 16.4 % pregnancies were achieved, i.e. 6.2 % less compared to synthetic medium and 3.3 % less than in cocultivation.

**Conclusion:** There is evidence of better IVF/ET results in case of prolonged culture time. The experience in our centre has shown the need of reevaluation of the coculture method. The exacting character of its preparation and manipulation will have to be replaced by synthetic media in spite of their high price.

Bylo prokázáno, že prodloužená kultivace lidských embryí má příznivý vliv na výsledky programu in vitro fertilizace [3, 5, 9, 12, 21, 24]. Naše pracoviště bylo jedním z prvních center asistované reprodukce, které k tomuto účelu začalo využívat jednak kokultivace embryí s lidskými ovidukálními buňkami a jednak kultivace v plně definovaném syntetickém médiu [1, 17, 25].

Prodloužená kultivace za hranici 48 hodin umožňuje eliminovat neživotaschopná embrya na jedné straně a lepší výběr nejlépe se vyvíjejících a morfologicky kvalitních embryí pro transfer na straně druhé. Dále to umožňuje pozdější provedení embryotransferu, kdy je děložní sliznice lépe připravena pro implantaci. Z tohoto důvodu může být i snížen počet přenášených embryí při zachované stejné šanci na otěhotnění.

Jedním způsobem prodloužení doby vývoje embryí in vitro je společná kultivace, tzv. kokultivace, se somatickými buňkami (luteinizované granulózoové buňky, epitelie lidského endometria, kožní fibroblasty, ovidukální buňky, bovinní uterinní fibroblasty, opičí Vero buňky a další).

Druhým možným způsobem prodloužení kultivace embryí je využití nových syntetických médií. V roce 1994 začalo naše centrum používat při prodloužené kultivaci jako jedno z prvních evropských IVF pracovišť M3 médium (Day 3 medium, fa Medi-Cult, Dánsko), a to současně s olomouckou klinikou [7, 16].

V letech 1994 - 1995 byla problematika kokultivace embryí na tubárních epitelích řešena na našem pracovišti v rámci grantu MZ ČR č. 1820-2. Vycházeli jsme z předpokladu, že podmínky vývoje embrya při kultivaci na tubárních epitelích in vitro by měly být ze všech kokultivačních systémů neoptimálnější, neboť odpovídají podmínkám, které má embryo v odpovídajícím stadiu při průchodu tubou in vivo. Kokultivaci lidských embryí na lidských tubárních buňkách uvádí jako první Bongso et al. [3, 4].

Cílem naší práce je srovnání výsledků prodloužené kultivace embryí, kdy prodloužení kultivace za standardní limit 48 hodin bylo provedeno [1] kokultivací embryí na monovrstvě lidských tubárních epitelí a [2] použitím syntetického média.

## KLINICKÝ SOUBOR A METODIKA

### A. Preklinická část

Zavedení kokultivace embryí na tubárních epitelích do klinického programu IVF předcházelo rozpracování následující metodiky:

#### 1. Příprava primokultury lidských tubárních epitelí

Výchozím materiálem byly vejcovody získané při hysterektomii od žen v premenopauze [27].

Tubární epitelové buňky byly získány působením trypsinu (0,1% roztok) na sliznici, a to buď při 37 °C po dobu 3 hodin nebo při 4 °C po dobu 12 - 16 hodin. Tubární sliznice byla proprána ve fosfátovém pufru a epitelie mechanicky uvolněny do média. Po centrifugaci byl sediment buněk resuspendován v Dulbeccově živném médiu s přísadkou Hamova média F12 doplněným o bovinní fetální sérum (15%), inzulin (10 µg/ml), epidermální růstový faktor (1 ng/ml) a antibiotika.

Kultivace probíhala při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Růst byl kontrolován v invertovaném fázové kontrastním mikroskopu, přičemž každý druhý den byla prováděna výměna živného média. Monolayer tubárních epitelí se vytvořil po 7 - 10 dnech.

#### 2. Kryokonzervace a rozmrazování primárních kultur

Před zmrazením byla primokultura koncentrována centrifugací a resuspendována v kryoprotektivním médiu (10% dimethylsulfoxid - DMSO, 90% fetální telecí sérum). Buněčná suspenze o denzitě 1 x 10<sup>6</sup> ml buněk/ml byla rozdělena do pejetek, řízeně zmrazena (teplotní gradient 1 °C/min) a uchovávána v hluboko mrazicích boxech při -150 °C.

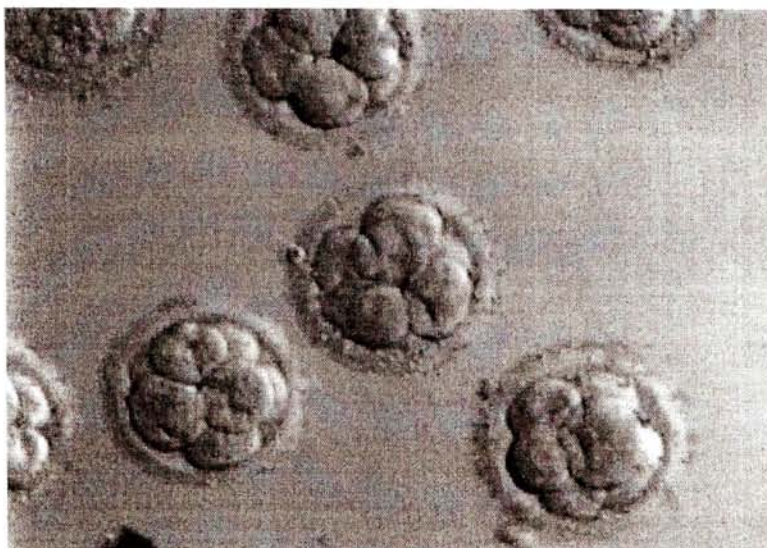
Na rozdíl od zamrazování má proces rozmrazení proběhnout co nejrychleji. Po vyjmutí z mrazicího boxu byla pejetka s buněčnou suspenzí ponořena do vodní lázně o teplotě 37 °C a za 1-2 minuty rozmrazena. V průběhu dalších 20 minut byla buněčná suspenze postupně ředěna médiem DMEM o teplotě 4 °C. Následovalo vymytí DMSO v průběhu centrifugace a převedení buněk do kultivačního média.

#### 3. Subkultivace tubárních epitelí a příprava monolayeru

Po opakovaném sérologickém vyšetření dárkyně (nejdříve 180 dnů od prvního odběru) bylo možné použít primokultury k vytvoření monolayeru pro kultivaci.

Rozmrazené epitelie byly proprány v médiu s fetálním sérem, zcentrifugovány a resuspendovány v živném médiu. Další kultivace probíhala opět při 37 °C v atmo-





**Obr. 3.** Embrya po prodloužení kultivace na 72 hodin (zvětšeno 200krát).

### 3. Klasická kultivace oocytů

Oocyty získané punkcí folikulů jsme po odběru umístili do média pro kultivaci (Earle, Sigma) obohaceného o 15 % fetálního pupečnickového séra. Kultivace probíhala při 5% CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 37 °C v kultivačním boxu (Hraeus). Oocyty byly ponechány 4 až 6 hodin k dozrávání a poté fertilizovány přidáním patřičného objemu spermií do média s oocyty. Za 17 až 20 hodin po oplození byly odstraněny kumulární buňky a kontrolována přítomnost prvojadér.

Kontrolní soubor zahrnuje po sobě následujících 250 výkonů klasické fertilizace in vitro s 48hodinovou kultivací.

### 4. Prodloužená kultivace

#### 4.1. Kokultivace embryí na tubárních epitelích (soubor I)

24 hodin po odběru byly vzniklé zygoty přeneseny na monolayer s Earlovým médiem a kultivace probíhala dále buď 48 hodin (celková doba 72 hodin), nebo 72 hodin

(celková doba 96 hodin). Hodnotíme soubor 104 žen z období březen 1994 až únor 1996 (soubor I). V roce 1994 jsme kokultivovali po dobu 72 a 96 hodin, v roce 1995 byla celková délka kultivace 96 hodin (obr. 2, 3).

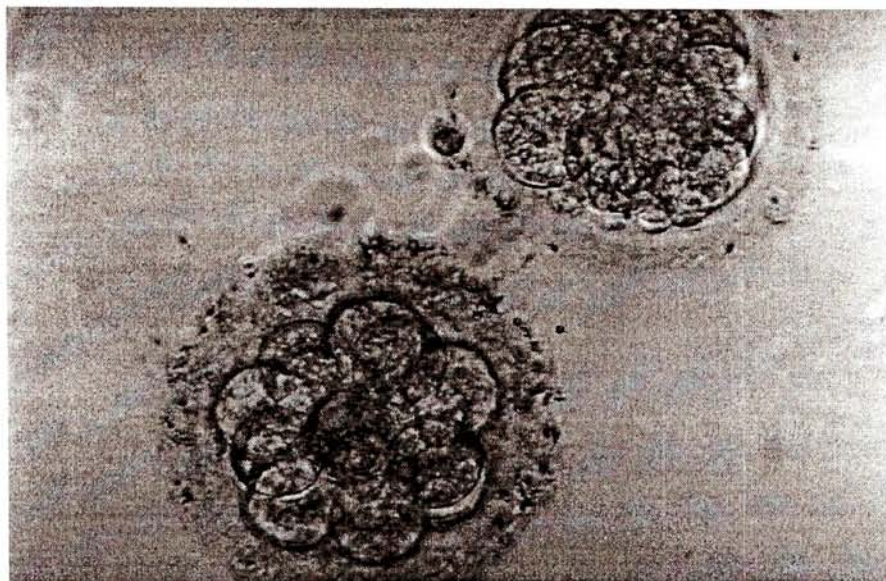
#### 4.2. Kultivace embryí v syntetickém médiu M3 (soubor II)

Do kompletně definovaného syntetického M3 média (Medi-Cult, Dánsko) byla přeložena již dělící se embrya za 48 hodin po odběru. Kultivace byla tímto způsobem prodloužena o dalších 24 - 48 hodin, tedy celkem na 72 až 96 hodin, v ojedinělých případech do 120 hodin (obr. 4).

Soubor II zahrnuje 249 pacientek, u kterých byla v období květen 1994 až únor 1996 provedena prodloužená kultivace v syntetickém médiu.

### 5. Embryotransfer a kryokonzervace embryí

V roce 1994 byla transferována maximálně 4 embrya. Od roku 1995 jsme snížili maximální počet trans-



**Obr. 4.** Moruly po kultivaci prodloužené na 96 hodin v syntetickém médiu (zvětšeno 500krát).



kální podmínky, jaké má embryo ve vejcovodu a v děloze [2]; c) kulturou buněk mohou být vytvářeny embryotrofní faktory, které pomáhají embryogenezi in vitro [7]; d) somatické buňky mohou detoxifikovat médium tím, že odstraňují kationty těžkých kovů nebo metabolické inhibitory, nebo oboje [8].

Pozitivní vliv kokultivace se může projevit vzrůstem počtu buněk embrya, zvýšením počtu embryí schopných dosáhnout až stadia blastocysty, lepší morfoloickou kvalitou s nižším výskytem fragmentací a/nebo zlepšením životaschopnosti embryí po transferu.

Například Bongso et al. [2, 3, 4] pozorovali signifikantní zlepšení vývoje embrya do stadia kavitované blastocysty. Nepozorovali však významný vliv na formaci expandované blastocysty nebo na proces hatchingu blastocyst. Yeung [16] uvádí lepší vývojový potenciál a nižší poměr fragmentace embryí při kokultivaci na lidských ovidukálních buňkách. Uvádí však, že procento hatchingu blastocyst bylo signifikantně vyšší u embryí kokultivovaných (38 %) než u embryí bez kokultivace (7 %).

Rovněž naše výsledky IVF při prodloužené kultivaci embryí prokázaly, že embrya dosahují vyšších vývojových stadií s dobrou morfoloickou kvalitou. Rovněž procento dosažených klinických těhotenství bylo vyšší - 3,3 % těhotenství na transfer u kokultivace (19,7 %), resp. o 6,2 % u syntetického média (22,6 %) proti klasické kultivaci (16,4 %). Počet dosažených klinických těhotenství na cyklus byl u kokultivace o 3,2 % vyšší (14,4 %) a u syntetického média dokonce o 9,3 % vyšší (20,5 %) než u klasické IVF (11,2 %).

Výsledky kokultivace embryí s ovidukálními buňkami hodnotíme jednoznačně jako pozitivní a přínosné pro program asistované reprodukce na našem pracovišti. Zejména v době před vyvinutím syntetických médií byla kokultivace se somatickými buňkami jediným možným řešením pro prodloužení kultivace. Dnes však, jednak vzhledem k náročnosti přípravy monolayerů a jednak k některým rozporuplným názorům na kokultivaci jako tako-

vou [1, 5], se jeví výhodnější a i efektivnější použití nových médií, vyvinutých pro tento účel.

Syntetické M3 médium (Day 3 Medium) podporuje další dělení a diferenciaci embryí. Je speciálně vyvinuté pro prodlouženou kultivaci, bez rizika virové infekce a přítomnosti látek, jejichž působení na gamety je třeba eliminovat. Použití M3 média dříve než za 48 hodin od odběru se nedoporučuje, neboť neobsahuje látky potřebné pro gamety a vývoj zygot. Rozdíl při použití syntetického média proti kokultivaci je v tom, že embrya se překládají do M3 média až ve stadiu čtyřbuněčném, tedy o den později než při překládání na monovrstvu epitelii.

Přikláníme se k názoru řady autorů, že kokultivace se somatickými buňkami je technologie přechodná. Další pokrok v kultivaci a technologii kultivačním médií by měl vést v blízké budoucnosti k opuštění využívání tkáňových kultur.

## ZÁVĚR

1. Obě metodiky prodloužené kultivace pomocí kokultivace na tubárních epitelích nebo v syntetickém M3 médiu výrazně zvýšily efektivitu programu asistované reprodukce proti klasické kultivaci.

2. Prokázali jsem příznivý vliv prodloužené kultivace na vývoj embryí in vitro, kdy embrya dosahovala vyšších vývojových stadií a morfoloické kvality než při klasické kultivaci.

3. Kokultivace embryí na tubárních epitelích je limitována mnoha faktory. Je náročná časově, na laboratorní vybavení, praktické zkušenosti a tým zabezpečující jednotlivé fáze.

4. Zavedení prodloužené kultivace v syntetickém médiu do klinické praxe bylo zcela jednoduché a nevyžaduje dlouhodobou přípravu a zkušenosti s tkáňovými kulturami. Za jedinou nevýhodu M3 média lze označit jeho vyšší cenu.

5. Domníváme se, že syntetická kultivační média zcela nahradí využití somatických tkáňových kultur v prodloužené kultivaci embryí.

## LITERATURA

1. Adler, J., Komárková, J., Ventruba, P. et al.: Kokultivace embryí s lidskými tubárními epitelii. Asistovaná reprodukce, 3, 1993, s. 14-16.
2. Bavister, B. D.: Co-culture for embryo development: is it really necessary? Hum. Reprod., 10, 1992, s. 1339-1341.
3. Bongso, A., Sathanathan, H., Ng, P. L. et al.: Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. Hum. Reprod., 4, 1989a, s. 706-713.
4. Bongso, A., Ng, S. C., Sathanathan, H. et al.: Establishment of human ampullary cell cultures. Hum. Reprod., 4, 1989b, s. 486-494.
5. Bongso, A., Fong, C. Y., Ratnam, S.: Co-cultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil. Steril., 56, 1991, s. 179-191.
6. Bongso, A., Fong, Ch., Ng, S. C., Ratnam, S.: The search for improved in-vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. Hum. Reprod., 8, 1993, s. 1155-1162.
7. Březinová, J., Oborná, I., Dostál, J. et al.: Prodloužení kultivace embryí v programu IVF a ET. Čes. Gynek., 60, 1995, s. 38-39.
8. Gandolfi, F., Moor, R. M.: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fertil., 81, 1987, s. 23-28.
9. Menezo, Y., Guerin, J. F., Czyba, J. C.: Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of Vero cells. Biol. Reprod., 42, 1990, s. 301-306.
10. Menezo, Y., Hazout, A., Dumont, M. et al.: Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum. Reprod., 7, 1992, Suppl. 1, s. 101-106.

11. **Ouhibi, N., Menezo, Y., Benet, G., Nicollet, B.:** Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum. Reprod.*, 4, 1989, s. 229-235.
12. **Plachot, M., Antoine, J. M., Alvarez, S. et al.:** Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 2133-2140.
13. **Sakkas, D., Trounson, A. O.:** Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 1990, s. 109-118.
14. **Schillaci, R., Criminna, R., Cefalu, E.:** Vero cell effect on in vitro human blastocyst development: preliminary results. *Hum. Reprod.*, 6, 1994, s. 1131-1135.
15. **Ventruba, P., Čupr, Z., Pilka, L., Žáková, J.:** Transvaginální odběr oocytu pod kontrolou vaginální sonografie: 1987-1990. *Gynekolog*, 1, 1992, s. 5-7.
16. **Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J. et al.:** Srovnání prodloužené kultivace embryí na monovrstvě lidských ovidukálních buněk a v syntetickém médiu. *Asistovaná reprodukce*, 4, 1994, č. 2, s. 13-14.
17. **Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J. et al.:** Prolonged Cultivation of Human Embryos: Coculture on Human Tubal Epithelia versus a Synthetic Medium. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12, 1995 (Suppl.), s. 55S.
18. **Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J. et al.:** Prolonged Cultivation of Human Embryos: Coculture on Human Tubal Epithelia versus a Synthetic Medium. In: IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Vienna, April 3-7, 1995, Monduzzi Editore, Bologna (Italy), 1995, s. 429-433.
19. **Ventruba, P., Žáková, J., Crha, I. et al.:** The effects of prolonged cultivation and assisted hatching on improving IVF results. *Contracept. Fertil. Sex.*, 23, 1995, Suppl. 9, S142.
20. **Wetzels, A. M. M., Punt, A. P. E. M., Van der Zalm, B. et al.:** The effects of human skin fibroblast monolayers on human sperm motility and mouse zygote development. *Hum. Reprod.*, 7, 1992, s. 852-856.
21. **Wiemer, K. E., Cohen, J., Wiker, S. R. et al.:** Co-culture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil. Steril.*, 52, 1989, s. 503-508.
22. **Yeung, W. S. B., Ho, P. C., Lau, E. Y. L., Chan, S. T. H.:** Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum. Reprod.*, 7, 1992, s. 1144-1149.
23. **Zetová, L., Marděšič, T., Miková, M. et al.:** Improved Development of Human Embryos Cultured on a Vero Cell Monolayer. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10, 1993, s. 234-236.
24. **Zetová, L., Miková, M., Marděšič, T. et al.:** Faktory ovlivňující výsledky in vitro fertilizace - V. Kokultivace embryí. *Čes. Gynek.*, 60, 1995, s. 143 - 145.
25. **Žáková, J., Adler, J., Ventruba, P. et al.:** Human Oviductal Epithelia Co-culture System for IVF. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, Suppl. 4, s. 200-201.
26. **Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I. et al.:** Výsledky prodloužené kultivace, asistovaného hatchingu a použití dárcovských spermií na I. gynek.-porod. klinice v Brně v roce 1994. *Asistovaná reprodukce*, 5, 1995, s. 10-12.
27. **Žáková, J., Ventruba, P., Adler, J. et al.:** Kokultivace embryí s buňkami lidského vejcovodu v programu asistované reprodukce na I. gynek.-porod. klinice v Brně. *Gynekolog*, 4, 1995, s. 124-127.

Projekt byl řešen s finanční podporou IGA MZ  
 ČR reg. č. 1820-2.

*Doc. MUDr. P. Ventruba, DrSc.  
 Obilní trh 11  
 656 77 Brno*

## 2. MIKROMANIPULAČNÍ TECHNIKY

Velký význam a přínos pro asistovanou reprodukci mělo zavedení mikromanipulačních technik. Předpokladem jejich provádění je mikromanipulační zařízení, sestávající z inverzního mikroskopu s vyhřívaným stolcem, mikromanipulátorů, mikroinjektorů a skleněných mikromanipulačních pipet (holding, hatching, biopsy, injection).

Primárním úkolem bylo využití fertilizačních mikromanipulací při řešení andrologického faktoru neplodnosti, avšak uplatnění našly i v dalších technikách - asistovaném hatchingu (AH) a biopsiích.

Tato zcela nová oblast mikromanipulačních technik se stala v letech 1994 – 1995 na našem pracovišti předmětem řešení grantového úkolu I. kategorie **IGA MZ ČR č. 1821-2 „Asistovaná fertilizace - mikromanipulace v oblasti zona pellucida zvyšující úspěšnost oplození a transferu embrya“** [106]. V době realizace projektu byly tyto techniky využívány pouze na několika předních evropských a světových pracovištích.

### 2.1. Fertilizační techniky

V případech mužské infertility, nízkého procenta oplozených oocytů nebo neúspěchu fertilizace se začaly používat metody asistované fertilizace.

Byly vyvinuty techniky, které spermiím usnadnily překonání zona pellucida (ZP). Vzestupnou řadou invazivnější a technicky náročnější.

**Zona drilling (ZD)** - poprvé popsali Gordon a Talansky v roce 1986 [30] znamená vytvoření lokálního otvoru v zona pellucida, např. působením kyselého Tyrodova roztoku.

**Parciální disekce zony (PZD)** - představuje mechanické narušení (nařiznutí) zony pomocí operační mikropipety. Obě tyto metody umožňují spermiím se suboptimálními parametry snadněji dosáhnout plasmatické membrány oocytu. Navíc umožňují přirozenou selekci spermií, neboť pouze ty spermie, u kterých proběhla kapacitace a fyziologicky normální akrozomální reakce, jsou schopné fúze s oolemou.

**Subzonální inseminace (SUZI)** – znamená mechanickou inzerci jedné nebo několika spermií přímo do perivitellinního prostoru. Byla zavedena jako další způsob obejít nedostatečné koncentrace a/nebo motility spermií [49]. Dovoluje fyziologickou interakci povrchu gamet vedoucí k aktivaci oocytu.

**Intracytoplazmatická injekce spermie do oocytu (ICSI)** - nejnáročnější technika, která

spočívá v přímé injekci jedné spermie do cytoplazmy oocyty a překonává tak všechny předchozí metody. Byla vyvinuta pro případy těžké oligoasthenozoospermie a případy se zcela immobilními či nezralými spermii. Tato technika byla poprvé užita u člověka v roce 1998 [48] a brzy bylo oznámeno první těhotenství po ICSI [69]. Jedná se o náročnou metodu vyžadující trpělivost a praxi.

Zkušenosti se zaváděním a prováděním fertilizačních mikromanipulačních technik jsou uvedeny v **Publikaci V, VIII a IX.**

### **Materiál a metodika:**

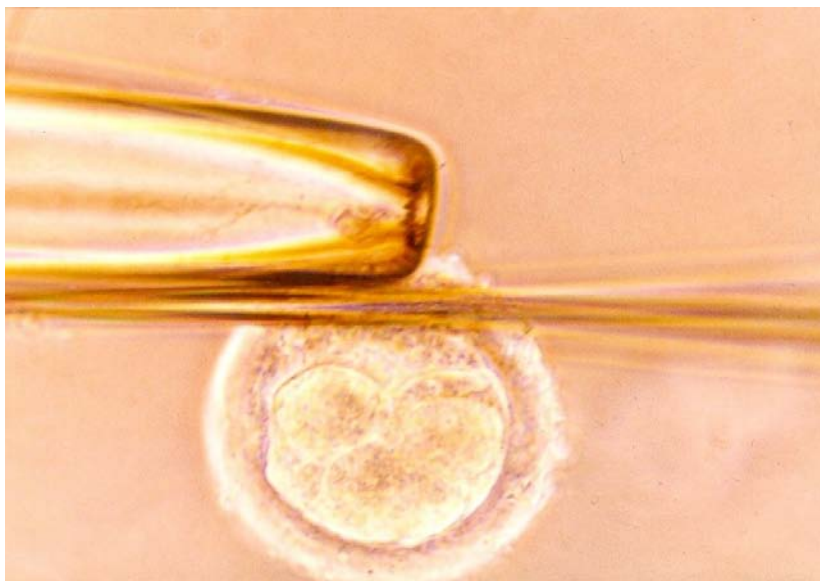
Nácvik mikromanipulačních technik jsme zahájili na podzim roku 1993. První mikromanipulační zařízení bylo vlastnictvím Biologického ústavu LF MU Brno a sestávalo z mikroskopu Leitz Fluovert FS a mechanických mikromanipulátorů Leitz (obr. 10).



Obr. 10: Mikroskop Leitz Fluoverts FS s mechanickými mikromanipulátory Leitz

V první fázi bylo třeba se naučit vyrábět mikropipety (držící, operační a injekční), protože nebyly komerčně dostupné (obr. 11). Vyráběli jsme je ze skleněných neheparinovaných kapilár vytažením na horizontálním nebo vertikálním tahači, dále byly opracovány na mikrokovárně a zabroušeny na brusce. Poté byly sterilizovány horkým vzduchem. Od roku 1995 již byly k dispozici první komerčně dostupné mikropipety (Humagen, COOK, Microtech).





Obr. 11: Mikromanipulační pipety vlastní výroby, provádění asistovaného hatchingu

V roce 1993 jsme začali nácvik manipulací s oocyty, které byly neúspěšně oplozeny nebo na degenerovaných oocytech. Nácvik spočíval ve fixaci oocytu, průniku mikropipety přes zona pellucida a cvičném provádění ZD, PZD a SUZI. V roce 1994 jsme prováděli ZD a PZD.

K provádění náročnější metody ICSI jsme přistoupili až po dostatečných zkušenostech a praxí v ovládní mikromanipulátorů, od konce roku 1995 [110]. V té době jsme již měli nové moderní mikromanipulační zařízení, jehož součástí byl inverzní mikroskop Nikon Diaphot 300,



Obr. 12: Mikromanipulační zařízení (s mikroskopem Nikon Diaphot 300)

trojrozměrně pohyblivé hydraulické mikromanipulátory Narishige a mikroinjektory IM-6 Narishige spojené teflonovou hadičkou s držáky mikropipet (obr. 12).

Od roku 2012 pracujeme s moderním automatizovaným mikroskopem Nikon Eclipse Ti, mechanickými a hydraulickými mikromanipulátory Narishige a mikroinjektory Eppendorf (obr. 13). Pipety k fixaci oocytu (holding) a ICSI mikropipety používáme od firem Microtech (ČR) a COOK (Austrálie).



Obr. 13: Mikromanipulační zařízení (s mikroskopem Nikon Eclipse Ti)

Veškeré mikromanipulace se provádějí na speciálních plastových miskách pod minerálním parafínovým olejem (OVOIL, Vitrolife) za pomoci mikropipet (obr. 14).



Obr. 14: Detail mikropipet nad miskou pro mikromanipulace



Obr. 15: ICSI, oocyt v metafázi II, spermie vpravo v mikropipetě  
zvětšení: 320 x

### Vlastní provedení ICSI:

Oocyty je třeba před ICSI zbavit kumulárních buněk, aby na ně bylo dobře vidět, což se provádí krátkodobým chemickým působením hyaluronidázy a mechanickou denudací. Zralé oocyty v metafázi II se přenesou na misku pro ICSI po jednom do kapek, které jsou umístěné kolem centrální kapky se spermii. Kapky jsou přelity minerálním olejem (OVOIL, Vitrolife) kvůli udržení teploty a pH média. Oplozování se provádí injekcí jedné spermie do cytoplazmy oocytu (obr. 15). Nejprve je vybraná spermie po imobilizaci nasáta do injekční mikropipety. Oocyt je před vpichem fixován pomocí držící (holding) mikropipety. Spermie je injekční mikropipetou proniknutím přes zona pellucida a oolemu vpravena do cytoplazmy. Po injekci všech oocytů, jsou oocyty přeneseny na kultivační misku a umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru ke kultivaci.

### Indikace k ICSI:

- snížené hodnoty spermioqramy (nízká koncentrace a/nebo pohyblivost spermií)
- získání spermií chirurgickým odběrem z varlete nebo nadvarlete
- selhání oplození oocytů v předchozích cyklech umělého oplodnění
- oplozování před preimplantační genetickou diagnostikou (PGD)
- v případech malého množství získaných oocytů
- v programu darovaných oocytů
- při oplozování oocytů po kryokonzervaci (před kryokonzervací odstraňujeme od oocytu buňky cumulus oophorus, což může vést ke změnám v zona pellucida, které snižují šanci na oplození klasickým oplozováním)
- věk ženy nad 35 let.

### Výsledky:

1. V průběhu tří měsíců roku 1994 jsme zvládli metodu výroby mikropipet, způsob zacházení s mikromanipulačním zařízením a způsoby manipulace s gametami a embryi.
2. V klinické praxi jsme v roce 1994 provedli ZD u 2 pacientek, avšak fertilizace oocytů nebylo dosaženo.
3. PZD byla provedena u 25 oocytů, z nichž u 2 došlo k polyspermii a pouze u 5 oocytů došlo k normální fertilizaci. Ze 2 embryotransferů nebylo dosaženo těhotenství.
4. Provádění SUZI jsme na našem pracovišti vynechali a od konce roku 1995 jsme zavedli techniku ICSI.

5. V roce 1996 jsme provedli již 109 výkonů ICSI, kde indikací bylo selhání fertilizace v předchozích cyklech, nebo hodnoty spermioqramu  $\leq 5$  mil/ml spermií a/nebo  $\leq 10$  % pohyblivých spermií.

Z celkového počtu 64 embryotransferů jsme dosáhli 12 klinických těhotenství, tj. 18,8 % PR.

6. V květnu **1996 jsme dosáhli prvního těhotenství po ICSI.**

7. Využití ICSI se rozšířilo i na další indikace a zájem o ně postupně vzrůstal (tab.1).

### **Závěr:**

Zavedení fertilizačních mikromanipulačních technik, neboli technik asistované fertilizace, do klinické praxe vyžadovalo náročnou preklinickou přípravu.

Pro nízkou úspěšnost fertilizace, riziko poškození oocyty při vytváření optimálně velkého otvoru v ZP, a významný výskyt polyspermie jsme upustili od technik ZD a PZD.

Metoda ICSI se od roku 1996 stala nejprínosnější a nejvyužívanější mikromanipulační technikou. V současné době tuto techniku nebo její kombinaci (část oocytů oplozována ICSI/část klasicky), provádíme u více než 90 % výkonů AR ročně. ICSI je řešením pro řadu párů které byly v předešlých výkonech odkázány na použití spermatu dárce.

**Tab. 1: Podíl cyklů, ve kterých byly oocyty oplozovány metodou ICSI z celkového počtu výkonů v letech 2003 – 2013 na GPK LF MU a FN Brno**

<b>Rok</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>
<b>Počet výkonů</b>	469	498	511	396	424	531	471	454	363	371	356
<b>Počet ICSI</b>	280	350	333	310	359	487	437	397	348	356	335
<b>ICSI (%)</b>	59,7	69,0	65,2	64,2	84,6	91,7	92,8	87,4	95,0	95,9	94,1

### **2.1.1. Techniky získání spermií z nadvarlete a varlete**

V návaznosti na praktické využití možnosti mikromanipulačně oplozovat oocyty spermiemi, kterých je nízký počet nebo mají malou až nulovou pohyblivost, jsme zavedli techniky, které umožnily získat spermie i u mužů s azoospermií.

Pomocí **mikrochirurgické aspirace spermií z nadvarlete – MESA** (Microepididymal Sperm Aspiration) nebo **extrakcí spermií z varlete - TESE** (Testicular Sperm Extraction) ve spojení



s ICSI se podařilo mužům s azoospermií dosáhnout vlastního potomstva. Pro tyto muže, bez šance na přirozenou koncepci, bylo do té doby jedinou nadějí použití spermatu dárce.

Azoospermie je mezi mužskou infertilní populací relativně častým nálezem. Rozlišujeme azoospermii obstrukční, spojenou s obstrukcí vývodných semenných cest či agenezí vas deferens, nebo neobstrukční, s defektní spermiogenezí. Podle typu azoospermie byla volena metoda získání spermií.

První zkušenosti s užitím epididymálních spermií při oplozování byly ve světě prezentovány v roce 1985 [93]. Těhotenství po oplození s testikulárními spermii bylo ve světové literatuře popsáno v roce 1993 [86]. V naší laboratoři jsme zavedli zpracování a použití spermií z MESA a TESE v roce 1996.

První zkušenosti a výsledky uvádíme v **Publikaci VI**.

### **Materiál a metodika:**

V období od září 1996 do dubna 1997 jsme zaváděli ve spolupráci s lékaři Urologické kliniky LF MU a FN Brno zpracování spermií pro ICSI po mikrochirurgickém odběru. Výkonům mikrochirurgické aspirace epididymálních spermií a testikulární biopsii prováděném urology, předcházelo podrobné andrologické vyšetření [68]. Získaná tekutina z epididymis v injekční stříkačce nebo kousky testikulární tkáně ve zkumavce s médiem jsou z operačního sálu přepraveny do embryologické laboratoře ke zpracování (obr. 16).

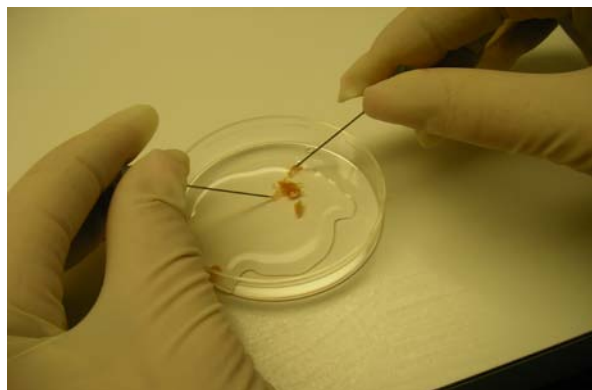
Při **MESA** se spermie separují z epididymální tekutiny promytím a centrifugací v gradientu Percollu. Vzniklý sediment je zakapán médiem a ponechán v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Při **TESE** je excidovaný bloček semenotvorných kanálků velikosti cca 3 x 3 mm přenesen ze zkumavky s médiem na Petriho misku, kde se testikulární tkáň rozvolní pomocí ostrých jehel (obr. 17) a rozkrájí skalpelem (obr.18). Poté je tkáň semenotvorných kanálků (obr. 19) promývána a centrifugována. V získaném sedimentu se vyhledávají spermie pro oplozování. Oplozování se provádí vždy technikou ICSI.

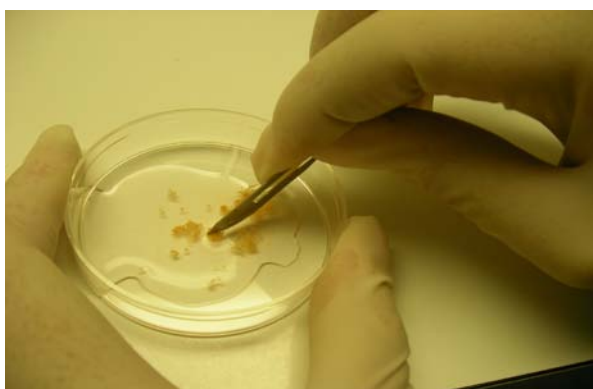
V případě získání dostatečného množství spermií provádíme jak přípravu pro oplození, tak kryokonzervaci vzorků pro případné použití v budoucích cyklech AR. Tím omezujeme nutnost opakování epididymálních aspirací a testikulárních extrakcí, které jsou pro muže psychicky zatěžující.



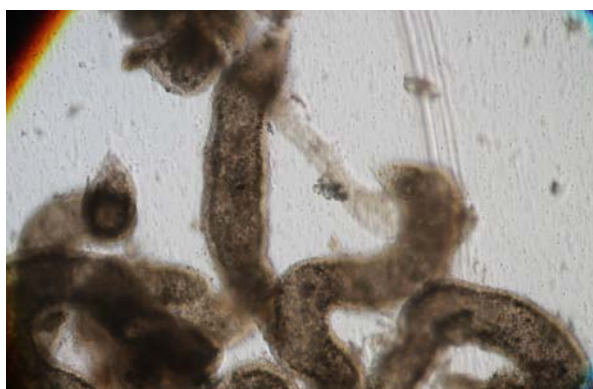
Obr. 16: Testikulární tkáň po TESE



Obr. 17: Rozvolnění semenotvorných kanálků



Obr. 18: Krájení semenotvorných kanálků



Obr. 19: Semenotvorné kanálky, zvětšení 40x

### Výsledky:

1. V období zavádění metody od září 1996 do dubna 1997 bylo provedeno 16 výkonů, z nichž bylo 6 v případě obstrukční azoospermie. Spermie byly získány metodou MESA. V 10 případech se jednalo o neobstrukční azoospermii, kdy z nadvarlete se nepodařilo získat žádné spermie, proto byla odebrána testikulární tkáň. Ze všech vzorků se podařilo preparací získat spermie k oplození oocytů.
2. Ve skupině ICSI+MESA (6 případů) bylo v období zavádění metody dosaženo 50,0 % fertilizace a 4 embryotransferů. Těhotenství nebylo dosaženo.
3. Ve skupině ICSI+TESE (10 případů) bylo ve stejném období dosaženo 51,0 % fertilizace, 10 embryotransferů a 1 těhotenství, které však skončilo spontánním abortem.
4. Od roku 1997 do konce roku 2013 bylo provedeno **122 výkonů MESA a 93 výkonů TESE**. Ze 105 embryotransferů bylo dosaženo 24 těhotenství, což činí **22,9 % PR**. Nižší úspěšnost je dána menším počtem kvalitních embryí, vhodných k transferování.
5. Spermie z MESA byly zamrazeny u 34 mužů, z TESE u 35 mužů.

### **Závěr:**

Účinnost metod MESA nebo TESE v kombinaci s ICSI byla prokázána v případech obstrukční i neobstrukční azoospermie. Fertilizace při kombinaci těchto technik u azoospermiků nás přesvědčily, že lze takto pomoci většině infertilních mužů ke svému biologickému potomstvu. Výkony MESA/TESE jsou prováděny ve spolupráci s urology z pracoviště FN Brno a staly se rutinní součástí asistované reprodukce.

### **2.1.2. Zpracování spermií při retrográdní ejakulaci**

Po zkušenostech s použitím ICSI i v nejtěžších případech andrologického faktoru jsme v letech 2006 až 2007 hledali způsob, jak získat spermie u mužů s retrográdní ejakulací. Zpětná ejakulace může postihovat až 2 % neplodných mužů a vyskytuje se až u 18 % mužů s azoospermií. Proto je třeba vždy v případě zjištěné azoospermie provést vyšetření močového sedimentu na přítomnost spermií. V klasické formě zpětné ejakulace není ejakulát vůbec produkován. V některých případech ejakulát může být produkován s nálezem azoospermie. Zvláště pokud je ejakulátu velmi malé množství 0,1 – 0,2 ml je třeba na tuto možnost myslet, s největší pravděpodobností se jedná pouze o sekret bulbo-uretrálních žláz.

Tématu retrográdní ejakulace a zpracování získaných spermií se věnuje **Publikace VII**.

### **Materiál a metodika:**

Vzhledem k tomu, že chirurgické řešení není v těchto případech úspěšné, hledali jsme metodu jak získat spermie z moči v takovém stavu, aby se jimi daly oplozovat oocyty. Nejprve bylo nutno provést alkalizaci moče. Po proběhlé ejakulaci se pacient vymočí do sterilní sběrné láhve a vzorek odevzdá do laboratoře k následnému zpracování. Moč se rozdělí do 15 ml zkumavek a centrifuguje se 5 min při 3000 otáčkách. Sediment se přenese do další zkumavky, resuspenduje v promývacím médiu a znovu 5 min centrifuguje. Po odstranění supernatantu je zbylá peleta převrstvena médiem a připravené spermie ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru [51].

### **Výsledky:**

1. V roce 2007 byla tato metoda získání spermií po retrográdní ejakulaci použita u 7 mužů.
2. U jednoho pacienta byly s časovým odstupem jednoho měsíce postupně ze 3 odběrů získány ojedinelé spermie s minimálním počtem pohyblivých, které byly zamrazeny. Poté byly všechny dávky rozmrazeny a spermie použity k oplozování 9 oocytů metodou

- ICSI. Oplozeno bylo 7 oocytů, k transferu byla vhodná 2 embrya. K otěhotnění nedošlo.
3. Celkem 3 páry s retrográdní ejakulací u muže podstoupily IVF. Podařilo se oplodnit 40 % oocytů, bylo dosaženo jedné gravidity, která skončila abortem.
  4. Úspěch získání životaschopných spermií z moči je závislý na vyloučení působení kyselého prostředí moči na spermie, resp. na bezpečné regulaci pH a osmolarity moči v době ejakulace.

### **Závěr:**

Od roku 2007 bylo provedeno pouze několik odběrů spermií po retrográdní ejakulaci. Potvrdili jsme, že námi prováděná technika získání a laboratorního zpracování moči se spermiemi otevírá prostor pro muže, aby se i s kompletní retrográdní ejakulací stali pomocí metod asistované reprodukce otci. Technika není příliš používaná, neboť pacienti i urologové volí pro získání spermií raději metodu MESA nebo TESE, kdy je šance získat spermie lepší kvality.

### **2.2. Asistovaný hatching u embryí**

Asistovaný hatching (AH) je další z mikromanipulačních technik. Její úloha není již fertilizační, ale provádí se v oblasti zona pellucida embrya před transferem a spočívá pouze v jejím arteficiálním narušení. Napomáhá zvýšit úspěšnost IVF/ET tím, že zvyšuje implantační potenciál embrya nejen mechanicky usnadněním procesu hatchingu, ale také tím, že dojde ke zprostředkování časnějšího kontaktu embrya s endometriem.

Na konci 80. let 20. století se ukázalo, že embrya, která se vyvíjela po PZD měla vyšší implantační poměr než embrya po konvenční inseminaci. Pozitivní vliv narušení zona pellucida pro úspěšnost implantace potvrdili Malter a Cohen, kteří pozorovali, že embrya s artifiční štěrbinou zahajují hatching dříve [55]. To vedlo k myšlence provádět artifiční otvor v zona pellucida u embryí před transferem. Tato technika byla součástí již zmiňovaného grantového úkolu **IGA MZ ČR č. 1821-2, Asistovaná fertilizace – mikromanipulace v oblasti zona pellucida zvyšující úspěšnost oplození a transferu embrya**, řešeného v letech 1994 – 1995 na našem pracovišti [106].

Asistovaný hatching jsme začali provádět v roce 1994 jako první rutinní mikromanipulační techniku. Díky nácviku těchto „jednodušších“ mikromanipulací jsme potom mohli přistoupit s větší sebedůvěrou k náročnější technice ICSI.

Zkušenosti a počáteční výsledky provádění asistovaného hatchingu byly postupně prezentovány v **Publikaci VIII** a **Publikaci IX**.

### **Materiál a metodika:**

Provedení metody spočívá v chemickém (Tyrodův roztok), fyzikálním (laser), či mechanickém narušení zona pellucida za využití mikromanipulačního zařízení. V naší laboratoři se nejvíce osvědčil způsob mechanického narušení ZP. Provádí se tak, že embryo je fixováno holding mikropipetou a operační mikropipetou je vytvořen otvor v zona pellucida. Po průniku operační mikropipetou přes zona pellucida je pohybem mikropipet proti sobě proříznut otvor (obr. 11).

### **Výsledky:**

1. V období zavádění metody (březen 1994 až prosinec 1995) jsme provedli 41 transferů s AH u 121 embryí [120].
2. V roce 1995 jsme publikovali počáteční soubor 14 pacientek s AH, s dosažením 35,7 % PR.
3. Další soubor publikovaný v roce 1996 s 20 pacientkami s provedeným AH vedl k 6 klinickým těhotenstvím, což činilo 30,0 % PR [122].
4. Větší soubor 41 pacientek publikovaný v roce 1996, u kterých bylo dosaženo 11 klinických těhotenství, vedl k výsledku 26,8 % PR. Při srovnání výsledků IVF –AH a výsledků IVF +AH v této práci jsme prokázali zvýšení úspěšnosti s AH o více než 8 % PR.
5. V práci z roku 1997, uvádíme výsledky za období 1994 až 1996, kdy byl transfer embryí po AH proveden již u 146 pacientek s výsledkem 37 klinických těhotenství, tj. 25,3 % PR (tab. 2). Při srovnání výsledků IVF - AH s IVF + AH došlo ke zvýšení úspěšnosti při provedení AH o 6,0 % PR [110].
6. Z postupně získaných výsledků je zřejmé, že se zvětšováním se souboru pacientek u kterých byl provedený AH, se snižovalo procento klinických těhotenství/ET, což eliminuje počáteční chybu malých čísel, která je spojena vždy s každou nově zaváděnou technikou. Přesto AH významně zvýšil procento klinických těhotenství na embryotransfer.
7. **Porodu prvního dítěte po AH jsme dosáhli v roce 1994.** V roce 1996 jsme dosáhli prvního porodu a současně prvních dvojčat po metodě ICSI v kombinaci s AH.
8. Asistovaný hatching se stal **rutinní součástí nabízených technik** a provádí se dodnes. Od roku 2003 do roku 2013 se procento transferů s provedeným asistovaným hatchingem u embryí téměř zdvojnásobilo (tab. 3).

**Tab. 2: Nárůst výkonů s AH a procento pregnancy rate (PR) v počátečním období na GPK LF MU a FN Brno**

Rok	Počet transferů	Počet transferů + AH	Procento transferů + AH	PR (%)
1995	197	14	7,1	35,7
1996	432	41	9,5	26,8
1997	367	146	39,7	25,3

**Tab. 3: Podíl transferů s provedeným AH v letech 2003 – 2013 na GPK LF MU a FN Brno**

Rok	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Počet ET	553	453	460	417	474	546	460	463	377	410	374
Počet AH	217	285	264	245	307	395	344	331	292	316	269
AH (%)	39,2	62,9	57,4	58,8	64,8	72,3	74,8	71,5	77,5	77,1	71,9

### **Závěr:**

Asistovaný hatching je přínosná metoda zvyšující šanci na úspěšnou implantaci embryí. Je doporučován ženám se zvýšeným FSH, při věku 38 let a více, při viditelném ztluštění ZP, v případě opakovaných neúspěšných ET a v případě transferu embryí po kryokonzervaci. Dlouhodobě má zájem o AH více než 70 % pacientek.

### **2.3. Biopsie buněk**

Mikromanipulace s gametami a embryí vedly k rozšíření využití této techniky k biopsiím buněk z oocytu nebo embrya.

Velký laboratorní zlom znamenala biopsie embryí, jejíž dopad spočívá v možnostech provádět metody určené k identifikaci chromosomálních aberací či monogenně dědičných chorob - preimplantační genetickou diagnostiku (PGD) a preimplantační genetický screening (PGS). Z těchto metod zmíním pouze mikromanipulační část, která se provádí v embryologické laboratoři, a to odběr buněk pro genetické vyšetření.

**Biopsie blastomer embrya** se provádí v 6 až 8 buněčném stádiu. Při odběru jedné až dvou blastomer je zajištěný bezpečný následný vývoj embrya a nedojde k jeho poškození.

**Biopsie pólového tělíska** je metodou odběru buněk z oocyty. Pólová tělíska se vytvářejí v průběhu meiotického dělení před (první pólové tělísko) a po (druhé pólové tělísko) oplození vajíčka spermií. Genetický materiál pólových tělísek obsahuje haploidní sadu maternálních chromozomů komplementární k sadě obsažené ve vlastním oocyty. Analýza pólového tělíska není vhodná při PGD v případě, že nosičem mutace je otec. Nejčastěji se biopsie polárního tělíska uplatňuje v diagnostice aneuploidii.

**Biopsie blastocysty** se v poslední době stále více upřednostňuje. Odběr buněk z trofektodermu blastocysty a jejich vyšetření by mělo dát přesnější výsledek PGD. Hypotéza vychází z faktu, že 6 až 8 buněčná stadia embryí jsou často mozaikovitá, což vede k falešně pozitivnímu nebo falešně negativnímu výsledku v závislosti na tom, která blastomera byla odebrána a navíc může dojít samokorekcí k odloučení abnormální buněčné linie [5, 12].

Buňky trofektodermu se odebírají ve stadiu vývoje, kdy embryo sestává z více než 100 buněk. Výhodou této techniky pro molekulární diagnostiku je odběr většího počtu buněk (10 – 30), což významně zvyšuje přesnost výsledku genotypizace [45]. Pro odběr buněk trofektodermu je doporučena laserová incize zona pellucida, po které je herniací vypuzena část buněk, jež mohou být odebrány pro vlastní vyšetření [42].

Na našem pracovišti **provádíme od roku 2000 biopsie blastomer u 6 až 8 buněčného embrya**. Nejprve provedeme mechanicky otvor v zona pellucida a poté odebíráme blastomery pomocí tenké skleněné biotické mikropipety (obr. 20). Každá blastomera je přenesena do samostatné kapky média. Další úkony spočívají v přípravě blastomer ke genetickému vyšetření.



Obr. 20: Biopsie blastomery z 8 buněčného embrya, zvětšení: 400 x



## **PUBLIKACE V**

# Intracytoplasmatická injekce spermie do oocytu a asistovaný hatching - mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro

P. Ventruba, J. Žáková, I. Crha, S. Němcová

V posledních dvaceti letech zaznamenala reprodukční medicína neobyčejný rozvoj a řadu úspěchů. Po zavedení tuboperitoneální mikrochirurgie na konci sedmdesátých let, to byla zejména **fertilizace in vitro (IVF)** a **transfer embrya (ET)**, která rozšířila léčbu tubárního faktoru a posléze dalších příčin sterility. Od IVF/ET byly postupně vyvinuty další techniky, dnes nazývané **asistovaná reprodukce (AR)**. V devadesátých letech asistovaná reprodukce, zajišťující optimalizaci oplození in vitro, přešla k mikromanipulaci s gametami resp. embryi.

**Mikromanipulace v oblasti zona pellucida (ZP)** oocytu nebo embrya zahrnuje metody **asistované fertilizace (AF)** a asistovaného uvolnění embrya ze zona pellucida - **asistovaný hatching (AH)**. Cílem je zvýšení úspěšnosti oplození in vitro, zejména dosáhnout fertilizace oocytu v případech andrologického faktoru a těhotenství u žen s opakovaně neúspěšným embryotransferem. Významný je etický přínos, neboť lze dosáhnout těhotenství i u těch párů, které dosud byly odkázány na oplození spermatem dárce nebo adopci.

## Metodika

### 1. Asistovaná fertilizace

Jde o techniky vhodné v případech neúspěchu fertilizace nebo nízkého procenta fertilizovaných oocytů. Využití je hlavně v případech mužské infertility, zejména oligozoospermie (méně než 20

mil. spermií/ml) a/nebo asthenozoospermie (méně než 40 % motility) a/nebo vysoké procento abnormálních spermií (více než 50 %). Aby mohlo dojít k fertilizaci, musí spermie nejprve penetrovat kumulus a ZP. Zatímco kumulus může být odstraněn bez negativního dopadu na fertilizaci a následný vývoj embrya, zona pellucida zůstává bariérou v případech malého počtu, špatné pohyblivosti a abnormálních forem spermií. Vyvinuté mikromanipulační techniky umožňují spermiím oplodnit oocyt za současné minimalizace nebezpečí zničení zony.

Asistovaná fertilizace zahrnuje techniky:

- ZD (zona drilling) - perforace zona pellucida
- PZD - parciální disekce zony pellucida
- SUZI - subzonální inseminace
- ICSI - intracytoplasmatická injekce spermie

Metody jsou vzestupnou řadou invazivnější a technicky náročnější.

*Zona drilling* znamená vytvoření lokálního otvoru v zona pellucida, např. působením kyselého Tyrodova roztoku.

*Parciální disekce ZP* představuje mechanické naříznutí zony pomocí operační mikropipety.

Obě tyto metody umožňují spermiím se suboptimálními parametry snadněji dosáhnout plasmatické membrány oocytu. Navíc umožní přirozenou selekci spermií, neboť pouze ty spermie, u kterých proběhla kapacitace a fyziologicky nor-

mální akrozomální reakce, jsou schopné fúze s oolemou.

*Subzonální inseminace* znamená mikroinjekci jedné nebo několika spermií pod ZP za současné možnosti normální fúze. Dovoluje fyziologickou interakci povrchu gamet vedoucí k aktivaci oocytu.

*Intracytoplasmatická injekce spermie* je vhodná zvláště v případech těžké oligoasthenozoospermie a v případech zcela imobilních či dokonce nezralých spermií. Dnes je dominující metodou až výhradní technikou AF.

### 1.1. ICSI - intracytoplasmatická injekce spermie

Techniku ICSI jsme na našem pracovišti zavedli na podzim 1995. Metoda spočívá v přímé injekci jedné spermie do cytoplasmy zralého oocytu. Vybraná spermie je znehybněna a nasáta do mikroinjekční pipety s co nejmenším množstvím média. Poté fixujeme oocyt s pólovým tělískem v poloze 12 nebo 6 a spermie je injektována v poloze 3 (obr. 1, 2). Výkon provádíme na mikromanipulačním zařízení sestávajícím z mikroskopu Nikon Diaphot 300 a mikromanipulátorů Narishige. Používáme mikropipety pro fixaci embryí (holding) a mikroinjekční pipety (COOK, Microtech).

#### Mikromanipulační zařízení

- *Nikon Diaphot 300 - inverzní mikroskop s Hoffmanovým modulačním kontrastním systémem a vyhřívaným stolcem*
- *Mikromanipulátory Narishige - mechanické a hydraulické*
- *Mikroinjektory IM-6 (Narishige)*
- *Mikromanipulační mikropipety skleněné (COOK, Humagen, Microtech)*
- *Provádění pod parafínovým minerálním olejem (Sigma)*

### 2. Asistovaný hatching

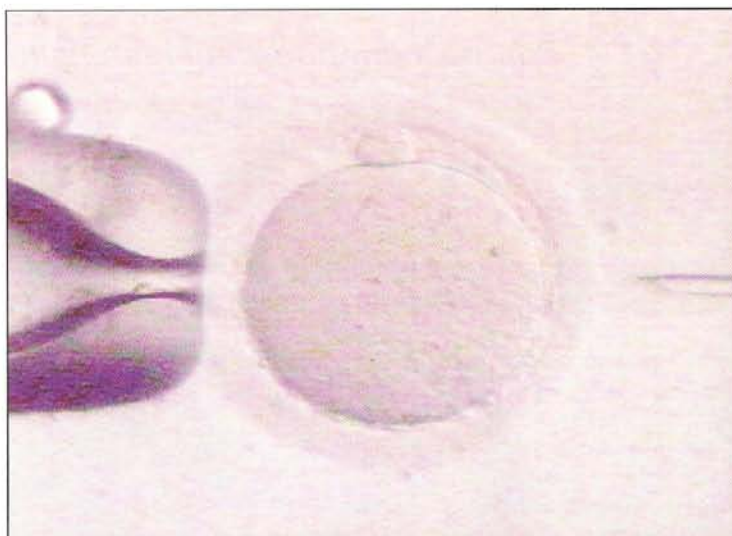
Jde o techniku narušení ZP embrya před jeho transferem do dělohy. Může se provádět:

(a) **mechanicky** - perforací nebo narušením ZP využitím mikromanipulačního zařízení,

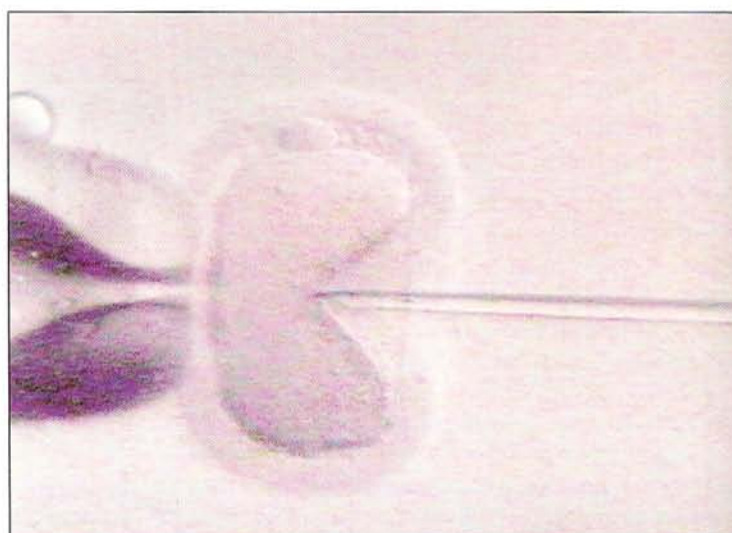
(b) **chemicky** - částečnou destrukcí ZP snížením pH, např. kyselým Tyrodovým roztokem

(c) **laserovým mikropaprskem** [16].

Cílem AH je ulehčit uvolnění embrya ze zona pellucida a zvýšení jeho implantační schopnosti. Vychází z hypotézy, že kultivace in vitro negativně ovlivňuje průběh hatchingu a větší procento fyziologicky se vyvíjejících embryí není schopné během expanze blastocysty opustit ZP a implantovat [1].



Obr. 1: Oocyt ve stádiu metafáze II (s vytvořeným pólovým tělískem) fixovaný holding mikropipetou před provedením ICSI.



Obr. 2: Mikroinjekční pipeta se spermií těsně před průnikem do cytoplasmy oocytu.



Asistovaný hatching jsme zavedli v březnu 1994 [15, 20, 21, 26]. Narušení zona pellucida provádíme na výše popsaném mikromanipulačním zařízení. Kromě holding mikropipet pro fixaci embryí používáme operační pipety pro vlastní narušení zony (COOK, Microtech). Arteficiální štěrbička je vytvořena po přichycení embrya fixační mikropipetou průnikem operační mikropipety skrz zonu bez kontaktu s blastomerami a poté proti držící mikropipetě (obr. 3, 4).

### 3. Výběr a příprava pacientek

Folikulární vývoj je stimulován gonadotropiny (hMG - Pergonal Serono, Humegon Organon, FSH - Metrodin Serono) v dávce 150 - 225 IU/den. Od roku 1995 jsme začali využívat GnRH-analoga v krátkém (Suprefact nasal spray, Hoechst) nebo dlouhém protokolu (Decapeptyl depot, Ferring-Léčiva). Ovariální hyperstimulace probíhá od 3. dne menstruačního cyklu s monitorováním 17-beta estradiolu, LH, progesteronu a ultrazvukové folikulometrie. Po dosažení adekvátní ovariální odpovědi je maturace oocytů indukována 5000 - 10000 j. lidského choriového gonadotropinu (hCG - Profasi Serono, Pregnyl Organon). Za 34 - 36 hod. po aplikaci hCG je proveden transvaginální odběr oocytů pod kontrolou UZ [22]

### 4. Kultivace oocytů a příprava spermií

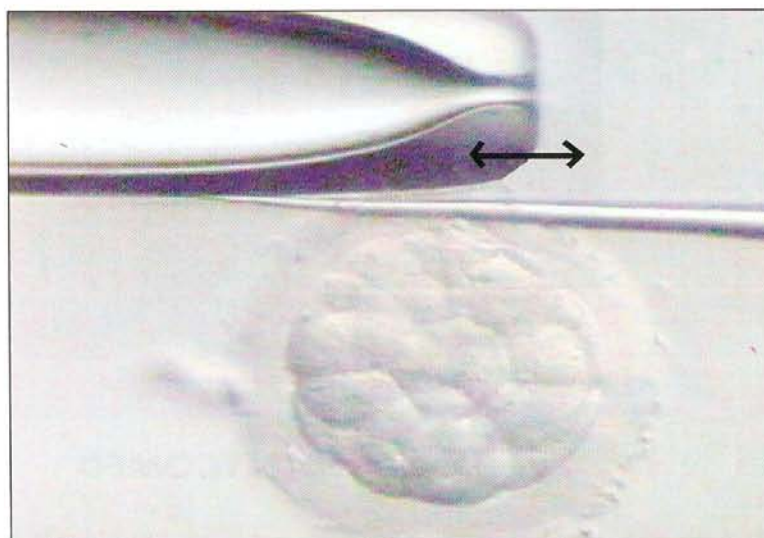
Oocyty jsou po odběru kultivovány v Earlově (Serva) a IVF médiu (Medicult). U oocytů určených pro asistovanou fertilizaci pokračuje příprava po nejméně dvouhodinové kultivaci v kultivačním boxu (Heraeus) v 5 % CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 37°C. Spočívá v odstranění buněk cumulus oophorus a corona radiata, které je nutné jednak k posouzení zralosti oocytu a jednak pro přesnou viditelnost vlastního oocytu (IVF médium s 80 IU hyaluronidázy/ml - Sigma). Po opakovaném opláchnutí oocytů v čistém kultivačním médiu je zhodnocena zralost oocytu a zjištěna přítomnost pólo-

vého tělíška (inverzní mikroskop, zvětšení 200x). Po převrstvení oocytů parafinovým olejem (Sigma) jsou tyto vráceny do kultivačního boxu. Pro ICSI jsou vybrány pouze oocyty s prvním pólovým tělíškem (metafáze II).

Ostatní oocyty jsou ponechány 4 až 6 hodin k dozrání a poté fertilizovány přidáním spermií do média s oocyty.



Obr. 3: Lidské embryo (morula) fixované holding mikropipetou.



Obr. 4: Mechanické provádění asistovaného hatchingu pomocí holding a operační mikropipety.



Kontrola oplození je prováděna 17 - 22 hodin po fertilizaci zjišťováním přítomnosti prvojader s následným překladem všech oocytů do čerstvého média. Při prodloužené kultivaci jsou rýhující se embrya po 48 hodinách přeložena do syntetického M3 média (Medi-Cult, Dánsko). Kultivace zde probíhá dalších 24 až 48 hodin.

Spermie jsou připravovány metodou centrifugace a swim up. Dvojnásobnou centrifugací části spermatu s vypíráním médiem (Dulbecco, Serva) je odstraněna seminální plazma. Vzniklá peletka čistých spermií je převrstvena kultivačním médiem (Earle, Sigma) a hodinu ponechána k vycestování pohyblivých spermií do horní vrstvy média a ke kapacitaci. Od roku 1996 používáme rovněž centrifugaci v 80/40 % Percollovém gradientu [28, 29].

### 5. Embryotransfer

Do roku 1994 byla na našem pracovišti transferována maximálně čtyři embrya, od roku 1995 přenášíme do dělohy maximálně tři kvalitní embrya (obr. 5, 6). V případech asistovaného hatchingu je embryotransfer (ET) prováděn 20 minut až 2 hodiny po mikromanipulaci [22].

## Výsledky

### 1. ICSI

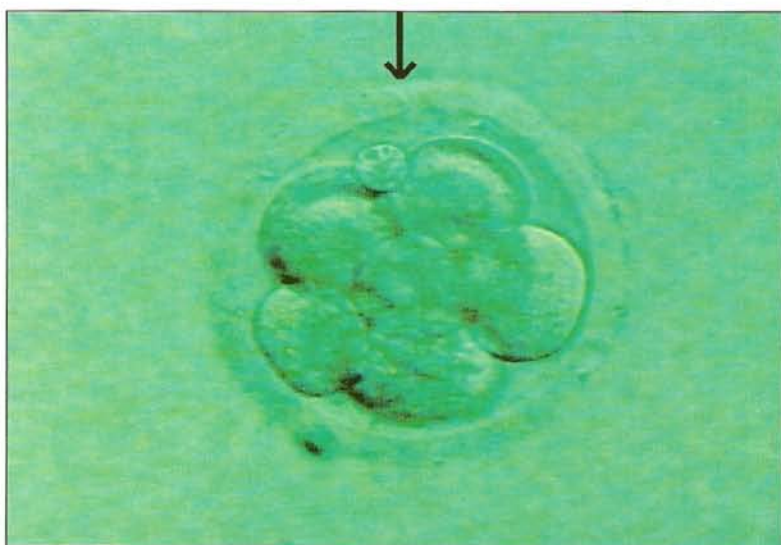
V roce 1996 bylo provedeno 109 výkonů ICSI s průměrem 5,4 získaných oocytů na aspiraci. Indikace byla jednak (1) selhání fertilizace v předchozích cyklech a (2)  $< 5$  ml/ml spermií a/nebo  $< 10$  % pohyblivých spermií. Mnohdy šlo o páry, které byly v předchozích cyklech odkázány na sperma dárce. Výrazný vzestup byl u fertilizace oocytů (44,7 %) a počtu ET na aspiraci. Z celkového počtu 64 transferů bylo dosaženo 12 klinických těhotenství, tj. 18,8 % na ET.

Rozčleněním souboru dle hodnot spermogramu jsme u skupiny s čistým andrologickým faktorem (skupina III) dosáhli nejlepších výsledků - 26,3 % klinických těhotenství na

transfer. Skupiny se nelišily ve věku pacientek a průměrném počtu získaných oocytů. Ve skupině normospermiků, i přes nejvyšší procento oplozených oocytů a ET/aspirace, bylo dosaženo jen 14,8 % klinických těhotenství na transfer (tab. 2).

### 2. Asistovaný hatching

V období 1994 - 1996 byl proveden asistovaný hatching u 147 pacientek. Indikací byly zejména



Obr. 5: 8-buněčné embryo s perforačním otvorem v zona pellucida po provedeném hatchingu.



Obr. 6: Embrya po asistovaném hatchingu připravená k transferu.



případy, kdy po opakovaných transferech 3 až 4 kvalitních embryí nedošlo k otěhotnění.

Během mikromanipulace došlo pouze u jednoho embrya k poškození zona pellucida se spontánní expulzí blastomer. Pacientkám byla transferována v 10 případech čtyři (v roce 1994), v 104 případech tři a ve 29 případech dvě mikromanipulovaná embrya. Pouze ve třech případech bylo transferováno jedno embryo po hatchingu.

Z celkového počtu 146 embryotransferů jsme dosáhli 37 klinických těhotenství, tj. 25,3 % klinických těhotenství na ET. V 12 případech otěhotněly pacientky, které za sebou měly více než tři neúspěšné transfery (tab. 3).

Srovnání výsledků klasické IVF s IVF+AH prokázalo zvýšení úspěšnosti o 6 % dosažených klinických těhotenství na transfer. Při hodnocení úspěšnosti AH dle věku pacientek jsme prokázali statisticky významný rozdíl mezi ženami do 35 a nad 35 let (tab. 4).

V tab. 5 rozebíráme dosažené výsledky po asistovaném hatchingu v závislosti na počtu transferovaných embryí. Prokázali jsme, že i když jsme od roku 1995 snížili maximální počet transferovaných embryí na tři, nedošlo ke snížení úspěšnosti dosažených těhotenství na ET.

## Diskuse

Úvodní klinické zkušenosti s mikromanipulačními technikami v České republice prokázaly výrazné zlepšení výsledků klasické IVF/ET [12, 21, 24, 26, 27]. V roce 1995 naše i slovenská literatura zaznamenala první úspěšně dokončená těhotenství po asistované fertilizaci, jmenovitě po SUZI a PZD [5, 7, 25]. Národní registr asistované reprodukce uvádí, že v roce 1994 byl asistovaný hatching nejčastější mikromanipulační technikou v ČR [19]. Ze 114 výkonů, což bylo 5 % všech léčebných ART cyklů, bylo dosaženo 36 klinických gravidit, tj. 31,6 % těhotenství na transfer. Ukazuje se, že úspěšnost mikromanipulačních technik v mnoha směrech předčí výsledky klasických postupů. Prvního těho-

tenství po ICSI v ČR bylo dosaženo v roce 1995 [15], kdy ze 105 cyklů s provedeným ICSI bylo dosaženo 75 transferů a 15 klinických těhotenství [20]. Na našem pracovišti jsme v květnu 1996 dosáhli prvního těhotenství v ČR po transferu rozmražených embryí po ICSI.

Prokazuje se, že jako v osmdesátých letech zvyšující se úspěšnost IVF ovlivnila rozšíření indikací, stejně tomu je u mikromanipulačních technik. Zejména to platí o ICSI, o jejíž popularizaci se zasloužil především tým Van Steirteghema [17, 18]. Většina center po počátečních zkušenostech s jinými technikami asistované fertilizace přechází výlučně na ICSI a pro nízkou úspěšnost ustupují od metod PZD a SUZI.

Zavedením ICSI na našem pracovišti jsme dosáhli zvýšení procenta fertilizace oocytů. Největší rozdíl byl u skupiny normospermiků. Za význam-

	IVF (předchozí c.)	ICSI (I - III)
Pacientek	60	117
Aspirace se získ. ooc.	90	109
Oocytů celkem	472	589
oploženo	41	263
Rýhování (%)	8,7	44,7
ET	9	64
ET/aspirace (%)	10	58,7
Klinických těhotenství	0	12
Klin. těhot./ ET (%)	0	18,8

Tab. 1: Srovnání ICSI s klasickou IVF v předchozích cyklech

	I.	II.	III.	Celkem
Pacientek	36	40	41	117
Aspirace s oocyty	34	36	39	109
Oocytů celkem	208	203	178	589
oploženo	106	98	59	263
Rýhování (%)	51	48,3	33,1	44,7
ET	27	18	19	64
ET/aspirace (%)	79,4	50	48,7	58,7
Klinických těhot.	4	3	5	12
Klin. těhot./ET (%)	14,8	16,7	26,3	18,8

I - > 20 mil/ml, > 40 % pohybl. spermií  
 II - 5-20 mil/ml, 10-40 % pohybl. spermií  
 III - < 5 mil/ml, < 10 % pohybl. spermií

Tab. 2: Rozbor výsledků ICSI - 1996

né považujeme zjištění, že zvýšení procenta klinických gravidit/ET se nejvýrazněji projevilo ve skupině s hodnotami spermioqramu  $\leq 5$  mil/ml spermií a/nebo  $\leq 10$  % pohyblivých spermií [30].

Klinické využití AH bylo vedeno zjištěním, že dělicí se embrya s dobrou prognózou implantace produkují aktivní komponentu, která redukuje

tloušťku zony, zřejmě jako přípravu na hatching [10]. Bylo pozorováno, že embrya vzniklá po mikromanipulačně provedené fertilizaci, vykazují vyšší poměr implantace [1]. Cohen se spol. prokázal, že asistovaný hatching je neefektivnější u embryí se ztlustělou zónou pellucida na více než 16  $\mu$ m. Selektivní AH se jeví úspěšný u žen ve věku nad 38 roků a u případů se zvýšeným FSH [2].

**S t i m u l a c e**  
a jednak suboptimální kulturní podmínky in vitro způsobují ztlustění zóny pellucida [8]. Jiní autoři demonstrovali, že tloušťka zóny pellucida souvisí se stádiem embrya a počtem blastomer. Ztlustění ZP snižuje schopnost blastocysty uvolnit se ze zóny pellucida a následně nidovat [23].

Pozitivní vliv narušení ZP pro úspěšnost implantace po-

	IVF	IVF + AH			celkem
	kontr.	1994	1995	1996	
Pacientek	122	18	23	106	147
ET	88	18	23	105	146
>8bb embrya (%)	75	72,8	77,4	73,7	74,2
Klin. těhotenství	17	5	6	26	37
Klin. těh./ET (%)	19,3*	27,7	26	24,8	25,3*

\* $p > 0,01$

Tab. 3: Asistovaný hatching - I. gynek. porod. klinika Brno

Asistovaný hatching - 1996	Věk pacientek			Celkem
	> 35 let	< 35 let		
ET	32	73		105
> 8bb embrya (%)	66,8	81,5		73,7
Klin. těhotenství	5	21		26
Klin. těhot./ET (%)	15,6*	28,3*		24,8

\* $p > 0,01$

Tab. 4: Výsledky asistovaného hatchingu v závislosti na věku

		Počet transferovaných embryí					1-4
		1	2	3	4		
1994	počet ET	0	5	3	10		18
	počet gravidit	-	0	1	4		5
	klin. grav./ET (%)	-	0	33,3	40		27,8*
1995	počet ET	0	7	16	0		23
	počet gravidit	-	2	4	-		6
	klin. grav./ET (%)	-	28,6	25	-		26,1*
1996	počet ET	3	17	85	0		105
	počet gravidit	1	2	22	-		26
	klin. grav./ET (%)	33,3	11,8	25,9	-		24,8*

\* $p < 0,01$

Tab. 5: Asistovaný hatching - závislost úspěšnosti ET na počtu transferovaných embryí



tvrdili Malter s Cohenem, kteří pozorovali, že embrya s arteficiální štěrbinou zahajují hatching dříve [11]. Přítomnost arteficiálního otvoru v ZP může zvyšovat implantaci embryí nejen mechanicky usnadněním procesu hatchingu, ale také tím, že dojde ke zprostředkování časnějšího kontaktu embrya s endometriem. Tento kontakt může zvýšit vývojový potenciál embrya a optimalizovat synchronizaci mezi embryem a endometriem, což vede ke zrychlení implantace [4, 6, 10].

Stále více pracovišť již provádí ICSI se spermii získanými mikročirurぎckými technikami MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration) a TESE (TEsticular Sperm Extraction) u mužů s azoospermii [3, 14]. Rovněž z těchto metod již bylo u nás dosaženo prvních gravidit [2, 9].

Celkově lze konstatovat, že vývoj asistované reprodukce, zejména u nových technik jako jsou prodloužená kultivace a mikromanipulace, se v posledních letech v České republice výrazně zrychlil. Nic na tom nemění fakt, že tyto techniky včetně zmrazování embryí nejsou zdravotními pojišťovnami hrazeny. Za jeden z předpokladů zlepšujících se výsledků asistované reprodukce v ČR lze považovat i zvýšenou dostupnost a hrazení gonadotropinů a GnRH-analog ze všeobecného zdravotního pojištění [13]. Nejlepším důkazem toho je zvyšující se počet klinických těhotenství na provedený transfer (ČR 1995: IVF 20,0 %, ICSI 19,7 % a AH 21,4 %) a hlavně počet narozených dětí párům, které byly dříve odkázány na adopcii [20].

## Závěr

1. Intracytoplasmatická injekce spermie do oocytu umožňuje léčbu párů s opakovaným selháním fertilizace při normospermii partnera, tak dvojic s mužskou infertilitou. Bylo dosaženo zvýšení procenta fertilizace oocytů i klinických gravidit na embryotransfer.

2. Provádění asistovaného hatchingu výrazně zvyšuje úspěšnost programu asistované reprodukce zejména u žen, které neotěhotněly po opakovaných kvalitních embryotransferech.

AH doporučujeme u žen se zvýšeným FSH, u žen ve věku nad 38 roků a při prokázaném ztluštění zona pellucida embrya. Prokázali jsme, že snížení maximálního počtu transferovaných embryí ze čtyř na tři neovlivnilo pravděpodobnost otěhotnění.

## Literatura

1. Cohen, J.: Assisted hatching of human embryos. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 8, 1991, s. 179 - 190.
2. Crha, I., Ventruba, P., Žáková, J., Pacík, D., Turianica, M.: Přínos ICSI, MESA a TESE pro léčbu mužské neplodnosti. *Asistovaná reprodukce*, 6, 1996, č. 2, s. 16 - 17.
3. Devroey, P., Silber, S.J., Nagy, Z., Liu, J., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Van Steirteghem, A.C.: Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 903 - 906.
4. Edwards, R.G., Brody, S.A.: *Principles and Practice of Assisted Human Reproduction*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1995, s. 692.
5. Herman, M., Hlinka, D.: Porod zdravého dieťaťa po subzonálnej inseminácii oocytov v programe IVF. *Slov. Gynek.*, 2, 1995, s. 21 - 22.
6. Herman, M., Hlinka, D., Pačín, J., Hredzák, R.: Prvé klinické skúsenosti s intracytoplasmatickou insemináciou oocytov v programe in vitro fertilizácie. Porod prvého dieťaťa. *Slov. Gynek.*, 3, 1996, s. 90 - 92.
7. Hlinka, D.: Použitie mikromanipulačných metód v humánnej asistovanej reprodukcii. *Slov. Gynek.*, 2, 1995, s. 18 - 21.
8. Khalifa, E., Tucker, M., Hunt, P.: Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Human Reprod.*, 7, 1992, s. 532 - 536.
9. Kočí, K., Lachman, M., Mayer, Z., Teplá, O., Míka, J.: První těhotenství v České republice dosažené kombinací MESA - ICSI: předběžné sdělení. *Čes. Gynek.*, 61, 1996, s. 302 - 303.
10. Liu, H., Cohen, J., Alikani, M., Noyes, N., Rosenwaks, Z.: Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil. Steril.*, 60, 1993, s. 871 - 875.
11. Malter, H., Cohen, J.: Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res.*, 24, 1989, s. 67 - 80.
12. Mardešič, T., Müller, P., Zetová, L., Miková, M., Štroufová, A.: Faktory ovlivňující výsledky in vitro fertilizace - IV. Význam stimulačních protokolů kombinujících analoga GnRH a hMG u žen ne-

úspěšně stimulovaných kombinací klomifencitrát - hMG.

Čes. Gynek., 60, 1995, s. 74 - 78.

13. Odborná komise MZ ČR pro fertilizaci in vitro: Pravidla pro poskytování, vykazování a úhradu výkonů asistované reprodukce.

Asistovaná reprodukce, 6, 1996, č. 1, s. 3 - 5.

14. Silber, S.J., Van Steirteghem, A.C., Liu, J., Nagy, Z., Tournaye, H., Devroey, P.: High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy.

Hum. Reprod., 10, 1995, s. 148 - 152.

15. Sobek, A., Hrbková, K., Priesnitz, J.: První těhotenství v České republice dosažené po fertilizaci oocytu pomocí ICSI - intracytoplasmatické injekce jedné spermie.

Čes. Gynek., 61, 1996, s. 3 - 6.

16. Strohmer, H., Feichtinger, W.: Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program.

Fertil. Steril., 58, 1992, s. 212 - 214.

17. Van Steirteghem, A., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smitz, J., Wisanto, A., Devroey, P.: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection.

Hum. Reprod., 8, 1993, s. 1061 - 1066.

18. Van Steirteghem, A., Nagy, Z., Liu, J., Joris, H., Verhezen, G., Smitz, J., Tournaye, H., Liebaers, I., Devroey, P.: Intracytoplasmic sperm injection.

Bailliere's Clin. Obstet. Gynecol., 8, No. 1, 1994, s. 85 - 93.

19. Ventruba, P.: Registr asistované reprodukce v České republice: výsledky roku 1994.

Asistovaná reprodukce, 5, 1995, 2, s. 4 - 22.

20. Ventruba, P., Hudeček, R.: Registr asistované reprodukce v České republice: výsledky roku 1995.

Asistovaná reprodukce, 6, 1996, 3, s. 3 - 22.

21. Ventruba, P., Žáková, J., Crha, I., Trávník, P., Adler, J.: The effects of prolonged cultivation and assisted hatching on improving IVF results.

Contracept. Fertil. Sex., 23, 1995, Suppl. 9, S142.

22. Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J., Crha, I., Němcová, S.: Mikromanipulace v oblasti zona pellucida embrya: asistovaný hatching 1994 - 1995.

Gynekolog, 1996, s. 37 - 41.

23. Wright, G., Wiker, S., Elsner, C., Kort, H., Massey, J., Mitchell, D., Toledo, A. and Cohen, J.: Observations on the morphology of human zygotes, pronu-

clei and nucleoli and implications for cryopreservation.

Human Reprod., 5, 1990, s. 109 - 115.

24. Zetová, L., Grocholová, R., Marděšič, T., Miko-ová, M., Müller, P., Vobořil, J., Štrouflová, A.: Asistovaný hatching - zkušenosti s prvními 137 případy.

Asistovaná reprodukce 4, 1994, č. 2, s. 11 - 12.

25. Zetová, L., Marděšič, T.: Úspěšné těhotenství a porod po asistované fertilizaci v programu IVF a ET v ÚPMD.

Čes. Gynek., 60, 1995, s. 204 - 205.

26. Žáková, J., Ventruba, P., Němcová, S., Adler, J.: Výsledky IVF po asistovaném hatchingu.

Asistovaná reprodukce, 4, 1994, č. 2, s. 9 - 10.

27. Žáková, J., Ventruba, P., Adler, J., Němcová, S.: Assisted Hatching - Results in Women with Repeated Embryotransfer Failure.

In: IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Vienna, April 3-7, 1995, Monduzzi Editore, Bologna (Italy), 1995, s. 539 - 541.

28. Žáková, J., Ventruba, P., Adler, J., Trávník, P., Němcová, S.: Asistovaný hatching - přínosná mikromanipulační technika pro ženy s opakovaně neúspěšným embryotransferem.

Čes. Gynek., 61, 1996, s. 7 - 9.

29. Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Petrenko, M., Rejdová, I., Němcová, S.: Výsledky prodloužené kultivace, asistovaného hatchingu a použití dárcovských spermií na I. gynek. porod. klinice v Brně v roce 1994.

Asistovaná reprodukce, 5, 1995, č. 1, s. 10 - 12.

30. Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Němcová, S.: Mikromanipulační techniky prováděné na I. gynek. porod. klinice v Brně.

Asistovaná reprodukce, 6, 1996, č. 2, s. 11 - 12.

**Doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.**

**přednosta I. gynekologicko - porodnické kliniky MU Brno**

**Obilní trh 11**

**656 77 Brno**

**tel.: 05/42321102**

**05/41213364**

**fax: 05/42321102/kl. 237**

**e-mail: ventruba@fp-brno.cz**

## **PUBLIKACE VI**



---

# První zkušenosti s technikami MESA a TESE při léčbě infertilních mužů s azoospermii

D. Pacík, M. Turjanica, J. Žáková\*

Urologická klinika FNŠP, Brno - Bohunice, přednosta doc. MUDr. D. Pacík

\* I. Gynekologicko - porodnická klinika MU, Brno, přednosta doc. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

---

## Souhrn

Autoři hodnotí první zkušenosti a výsledky využití techniky mikrochirurgické aspirace epididymálních spermií (MESA) a extrakce testikulárních spermií (TESE) v kombinaci s intracytoplazmatickou injekcí spermie do oocyty (ICSI) u mužů s azoospermii. Výše uvedené metody byly použity u 16 pacientů s opakovaně prokázanou azoospermii. Epididymální spermie byly získány v 6 případech, testikulární v 10 případech. S epididymálními spermiemi bylo po ICSI dosaženo 50% fertilizace, po ICSI s testikulárními spermiemi 51% fertilizace oocytů.

**Klíčová slova:** azoospermie - mikrochirurgická aspirace epididymálních spermií (MESA) - testikulární extrakce spermií (TESE) - intracytoplazmatická injekce spermie do oocyty (ICSI) - mužská neplodnost

## Summary

**Pacík, D., Turjanica, M., Žáková, J.: Initial Experience with MESA and TESE Techniques in the Treatment of Infertile Men with Azoospermia**

The authors evaluate their initial experience and results of the technique of microsurgical aspiration of epididymal sperm (MESA) and extraction of testicular sperm (TESE) combined with intracytoplasmic sperm injection into the oocyte (ICSI) in men with azoospermia. The above methods were used in 16 patients with repeatedly assessed azoospermia. Epididymal sperm was obtained in six instances, testicular sperm in 10 instances. With epididymal sperm after ICSI 50% fertilizations was achieved after ICSI, with testicular sperm 51% fertilization of oocytes.

**Key words:** azoospermia - microsurgical aspiration of epididymal sperm (MESA) - testicular extraction of sperm (TESE) - intracytoplasmic injection of sperm into the oocyte (ICSI) - male infertility

O.

*Rozhl. Chir., 76, 1997, No. 9, p. 463-467.*

---

## ÚVOD

Neplodnost, definovaná jako "neschopnost koncepce po jednom roce nechráněných pohlavních styků" (WHO, 1993), postihuje 15 - 20 % párů. U minimálně 30 - 50 % těchto párů je jediná nebo částečná příčina v jeho mužské komponentě. Mezi mužskou infertilní populací je azoospermie relativně běžným nálezem [1]. Dle definice se jedná o sterilní pacienty v pravém slova smyslu, neboť je u nich nulová šance na přirozenou koncepci. Rozlišujeme azoospermii obstrukční (spojenou s obstrukcí vývodných semenných cest či agenezí vas deferens) a neobstrukční (z defektní spermiogeneze - Sertoli cells only syndrom, maturation arrest). Výrazný pokrok v metodách asistované reprodukce, zvláště zavedení intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI) pak spolu s metodami mikrochirurgické aspirace epididymálních spermií (MESA) či testikulární extrakce spermií (TESE), umožnil léčbu

i mnohým mužům s azoospermii, kteří byli ještě před několika roky považováni za zcela neplodné a jejichž jedinou nadějí byla pouze arteficiální inseminace spermatem dárce nebo adopce. Práce chce upozornit na tyto nové léčebné možnosti a prezentovat naše první výsledky a zkušenosti.

---

## MATERIÁL A METODIKA

Od září 1996 do dubna 1997 byla ve spolupráci s I. porodnicko-gynekologickou klinikou MU metoda MESA/TESE využita u 16 pacientů s opakovaně prokázanou azoospermii.

Andrologické vyšetření před výkonem zahrnovalo detailní anamnézu včetně genetické, fyzikální vyšetření, 3krát spermiogram hodnocený dle standardů WHO, hormonální profil (testosteron, FSH, LH, prolaktin), stanovení protilátek proti spermiím třídy IgG



a IgA metodou Elisa, TRUS, genetické vyšetření. Protože kongenitální bilaterální absence vas deferens je považována za genitální fenotyp cystické fibrózy (CF), bylo u jednoho pacienta indikováno genetické screeningové vyšetření na CF i u partnerky. Izolovaná testikulární biopsie v rámci vyšetřovacího schématu nebyla indikována. Ženy absolvovaly potřebná vyšetření a léčbu v rámci programu asistované reprodukce I. gynekologicko-porodnické kliniky MU.

Operační výkon byl časově směřován v souladu s hormonální stimulací partnerky, pooperační délka hospitalizace byla průměrně 1,5 dne.

Mikrochirurgická aspirace epididymálních spermií byla prováděna následující technikou. V celkové anestezii, po jednostranné incizi skrota a tuniky vaginalis bylo zpřístupněno příslušné varle a nadvarle. Pod zvětšením 20 - 40krát pomocí operačního mikroskopu Zeiss byla mikronůžkami provedena drobná incize epididymální tuniky a vypreparován tubulus v proximální části nadvarlete. Hemostáza byla zajišťována bipolární mikropinzetou. Bez ohledu na délku nadvarlete, byla aspirace prováděna v nejproximálnější části nadvarlete, neboť bylo opakovaně prokázáno, že v této oblasti je lepší kvalita spermií [8]. Z mikroincize pak byla aspirována epididymální tekutina pomocí jemné plastické pipety TERUMO SURFLO 24 GX (0, 67 mm) do 0,5 ml Earlova média v tuberkulince. Incize v proximálním epididymálním tubulu byla uzavřena jednotlivými 10 - 0 nylonovými stehy jako prevence tvorby granulomatózní či aseptické zánětlivé reakce, jež by mohla ztížit případné následující aspirace. Tuberkulinka byla z operačního sálu transportována v malé kultivační komůrce do embryologické laboratoře, kde byly spermie z epididymální tekutiny s Earlovým médiem upraveny metodou gradientu Percollu.

Při absenci spermií v nadvarleti byla provedena testikulární biopsie a extrakce testikulárních spermií. V blízkosti rete testis byla krátkou incizí protnuta tunica albuginea testis. Excidovaný bloček semennotvorných kanálků velikosti cca 3 krát 3 mm byl umístěn do zkumavky s 1 ml Earlova média a v transportní komůrce přenesen z operačního sálu do embryologické laboratoře. Zde byla testikulární tkáň rozvodněna v Earlově médiu pomocí ostrých jehel, centrifugována a spermie byly získány centrifugací v 80/40 % gradientu Percollu. Incize v tunica albuginea testis byla uzavřena jemnými vstřebatelnými stehy. Současně byl ve všech případech odebrán bloček testikulární tkáně na histologické vyšetření do Bouinova roztoku.

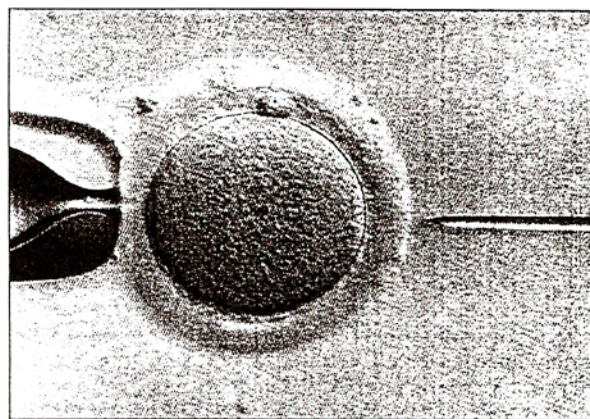
Ovariální stimulace a odběr oocytů - stimulace ovariální aktivity, odběr oocytů, fertilizace a kultivace byly prováděny způsobem rutinně zavedeným v Centru asistované reprodukce I. porodnicko-gynekologické kliniky MU v Brně [13]. Folikulární vývoj byl stimulován GnRH-analogy v krátkém (Superfact nasal spray, Hoechst) nebo dlouhém protokolu (Decapeptyl Depot, Ferring-Léčiva) společně s gonadotropiny v dávce 150 - 225 IU/den (FSH - Metrodin, Serono; hMG - Pergonal, Serono; Humegon, Organon). Ovariální hyperstimulace probíhá od 3. dne menstruačního cyklu s monitorováním 17-beta estradiolu, LH, pro-

gesteronu a ultrazvukové folikulometrie. Po dosažení adekvátní ovariální odpovědi byla maturace oocytů indukována 5000 - 10000 j. lidského choriového gonadotropinu (hCG - Pregnyl, Organon). Za 34 - 36 hodin po aplikaci hCG byl proveden transvaginální odběr oocytů pod kontrolou UTZ.

Oocyty byly po odběru kultivovány v Earlově (Serva) a IVF médiu (Medicult). U oocytů určených pro asistovanou fertilizaci pak pokračuje příprava po nejméně dvouhodinové kultivaci v kultivačním boxu (Heraeus) v 5% CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 37 stupních Celsia. Spočívá v odstranění buněk cumulus oophorus a corona radiata, které je nutné jednak k posouzení zralosti oocytu a jednak pro přesnou viditelnost vlastního oocytu (IVF médium s 80 IU hyaluronidázy/ml - Sigma). Po opakovaném opláchnutí oocytů v čistém kultivačním médiu byla zhodnocena zralost oocytu a zjištěna přítomnost pólového tělíska (inverzní mikroskop, zvětšení 200krát). Po převrstvení oocytů parafinovým olejem (Sigma) byly tyto vráceny do kultivačního boxu.

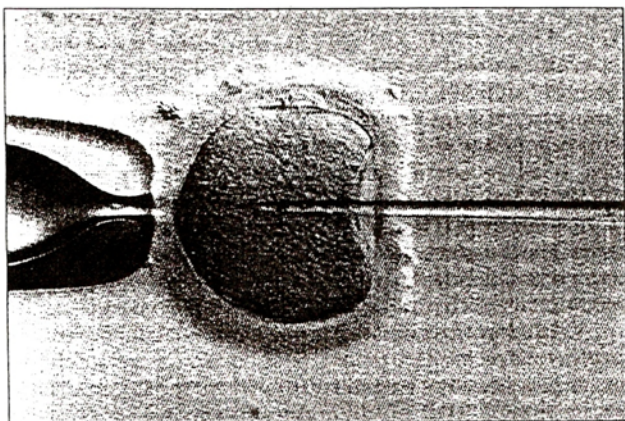
Asistovaná reprodukce byla prováděna na všech morfologicky normálních oocytech, pro ICSI byly vybrány pouze oocyty s prvním pólovým tělískem (metafáze II). Mikroinjekční procedura byla prováděna na vyhříváném stolku inverzního mikroskopu Nikon Diaphot 300 (Nikon) při zvětšení 400krát a za použití Hofmannova kontrastu. Mikroskop byl vybaven mikromanipulátory a mikroinjektory Narishige. Oocyty v kapkách IVF média a spermatická suspenze byly umístěny na Petriho misku (Falcon 1006) a převrstveny sterilním tekutým parafinovým olejem (Sigma) zahřátým na 37 stupňů Celsia. Při zvětšení 200krát byla pak vybraná spermie znehybněna a nasáta do mikroinjekční pipety s co nejmenším množstvím média. Poté byl fixován oocyt s pólovým tělískem v poloze 12 nebo 6 a spermie byla injektována v poloze 3 přes zónu pellucidu a oolemu do ooplazmy (Obr. 1, 2).

Kontrola oplození byla prováděna 17 - 22 hodin po fertilizaci zjišťováním přítomnosti prvojader s následným překladem všech oocytů do čerstvého média. Při prodloužené kultivaci byla rýhující se embrya po 48



Obr. 1. Oocyt ve stadiu metafáze II (s vytvořeným pólovým tělískem), fixovaný holding mikropipetou před provedením ICSI





Obr. 2. Mikroinjekční pipeta se spermii zavedená do cytoplazmy oocytu

hodinách přeložena do syntetického M3 média (Medi-Cult, Dánsko). Kultivace zde probíhala dalších 24 - 48 hodin. Do dělohy byla přenášena maximálně tři kvalitní embrya [2].

## VÝSLEDKY

Spermie vhodné k ICSI byly získány metodou MESA v 6 případech obstrukční azoospermie. V 10 případech neobstrukční azoospermie, kdy se z nadvarlete nepodařilo získat žádné spermie, byla odebrána testikulární tkáň na TESE. Vhodné spermie k ICSI se podařilo získat ze všech těchto vzorků. Histologické vyšetření potvrdilo sníženou spermatogenezi i v ně-

kterých případech obstrukční azoospermie. U neobstrukčních azoospermii jsme se nejčastěji setkali se zástavou vyzrávání (maturational arrest) na úrovni spermatogonií, spermatocytů nebo spermatid a se Sertoli cells only syndromem. Dostatečný počet spermii pro ICSI byl získán i ve třech případech, kdy histologický nález neprokázal přítomnost spermatozoí v testikulární biopsii.

Věk pacientů, počet získaných oocytů, počet fertilizovaných oocytů a kvalita embryotransferu jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Ve skupině ICSI kombinované s metodou MESA bylo dosaženo 50% fertilizace. Ve skupině ICSI kombinované s metodou TESE bylo dosaženo 51% fertilizace. V této druhé skupině bylo zaznamenáno jedno těhotenství, které však bylo ukončeno v 6. týdnu spontánním abortem (uterus arcuatus).

## DISKUSE

In vitro fertilizace (IVF) a transfer embrya (ET) byla původně vyvinuta k léčbě ženské infertility způsobené bilaterální tubární okluzí. Indikace IVF/ET se postupně rozšiřovaly i na další příčiny infertility, včetně jejího mužského faktoru. Od IVF/ET byly postupně vyvinuty další techniky, dnes nazývané asistovaná reprodukce. V devadesátých letech pak asistovaná reprodukce přešla k mikromanipulaci s gametami, resp. embryi. Asistovaná reprodukce zahrnuje následující techniky - ZD (zona drilling, tj. perforace zona pellucida), PZD (parciální disekce zony pellucida), SUZI (subzonální inseminace) a ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie). Uvedené metody jsou vztupnou řadou invazivnější a technicky náročnější, ze-

Tab. 1. Výsledky MESA v kombinaci s ICSI

Neploďný pár	Věk muže	Věk ženy	Počet získ. oocytů	Počet fertil. oocytů	Embryotransfer*
1	35	29	3	2	8/1, 4/1
2	41	36	3	1	4/3
3	28	28	4	2	8/1, 6/2
4	32	29	3	0	0
5	44	28	2	0	0
6	42	37	5	5	9/1, 6/2, 4/2

\* Embryotransfer je vyjádřen jako počet buněk / kvalita embrya

Tab. 2. Výsledky TESE v kombinaci s ICSI

Neploďný pár	Věk muže	Věk ženy	Počet získ. oocytů	Počet fertil. oocytů	Embryotransfer*
1	34	35	4	3	8/1, 6/2, 4/1
2	32	32	3	2	8/2, 6/3
3**	39	26	5	3	8/1, 8/1, 4/3
4	33	31	2	1	6/2
5	28	28	3	2	6/2, 4/3
6	41	31	5	1	4/3
7	41	35	5	1	4/3
8	29	28	14	7	8/1, 8/1, 8/2 + 3
9	36	30	4	2	kryo
10	44	33	10	6	2/2
					6/1, 6/2, 4/3

\* Embryotransfer je vyjádřen jako počet buněk / kvalita embrya

\*\* Spontánní abort v 6. týdnu těhotenství, uterus arcuatus



jména poslední z nich však umožnila v plné míře léčbu nejtěžších forem mužské infertility.

První zkušenost s použitím epididymálních spermií při IVF publikoval Temple-Smith v roce 1985 [3]. Zatímco úspěšnost MESA v kombinaci s klasickou IVF/ET nepřesahovala 20% fertilizaci, po zavedení ICSI je dosahováno 60% fertilizace na oocyt. Metoda mikrochirurgické aspirace epididymálních spermií je primárně indikována při inoperabilních formách obstrukční azoospermie (včetně vrozené absence vas deferens) a při selhání chirurgické terapie obstrukce (epididymo-vazostomie, vazovazostomie). Mezi pacienty s azoospermii a normální hladinou FSH nalézáme až 18 % případů kongenitální oboustranné absence vas deferens. U těchto pacientů klasické chirurgické řešení, tj. implantace arteficiální spermatokély, přinášelo úspěch maximálně ve 4 % případů [4]. Protože se velmi pravděpodobně jedná o genitální fenotyp cystické fibrózy (CF) [5, 6] je třeba zdůraznit nutnost genetického vyšetření na CF (typizací nejčastějších CF genových mutací) a to i u partnerky. Jsou-li oba partneři nositeli CF genové mutace, podstupují 25% riziko narození dítěte s CF. I v případě, že nositelem genové mutace je jen muž, musí být pár poučen o riziku narození chlapce s genitálním fenotypem CF, případně i dítěte s CF, neboť zatím nejsme schopni vyšetřením postihnout všechny možné genové mutace.

Jednotliví muži s izolovanou vrozenou absencí vas deferens mají zbytky nadvarlete různě dlouhé, přičemž u pacientů, jejichž délka nadvarlete přesahuje 4 cm, je dosahováno vyššího procenta fertilizací a těhotenství po kombinaci MESA s ICSI [7]. Délku nadvarlete lze zjistit pomocí ultrazvuku a pečlivého klinického vyšetření. Tato informace v kontextu s výsledkem genetického vyšetření může pacientům usnadnit rozhodování o ev. upřednostnění arteficiální inseminace spermatem dárce.

Bez ohledu na délku nadvarlete jsme všechny aspirace spermií prováděli z nejproximálnějších částí nadvarlete (caput nebo vasa efferentia), neboť byla opakovaně prokázána lepší kvalita spermií z této oblasti [8].

V případě, že se odběrem podaří získat dostatek kvalitních spermií, je možná jejich kryoprezervace. Tato pak omezuje nutnost opakovaných epididymálních aspirací, jež jsou pro oba partnery především psychicky značně zatěžující. Zamrazení epididymálních spermií jsme v našem souboru zatím použili u jednoho pacienta s obstrukční azoospermii.

První těhotenství po intracytoplazmatické injekci testikulární spermie bylo publikováno v roce 1993 [9], k rozvoji této techniky v České republice došlo v roce 1996 [13]. Dlouho se předpokládalo, že spermie je nezralá a neschopná oplození, dokud neopustí varle. Po vlastní spermatogenezi spermie prodělává funkční a strukturální změny, jako je vývoj progresivní motility a modifikace plazmatické membrány, jež umožňuje kapítaci a akrozomální reakci. Tyto změny se za normálních okolností odehrávají během transportu spermie nadvarletem. Je však dobře dokumentováno, že pohyblivé spermie jsou přítomny i v lidské testikulární tkáni, zvláště je-li celé nadvarle zničeno a histo-

logické vyšetření prokazuje kompletní spermiogenezi [10]. U pacientů s obstrukcí nadvarlete lze nalézt spermie s progresivním pohybem a dostatečnou fertilizační kapacitou již ve vasa efferentia [11]. Většinou jsou však získané spermie nepohyblivé nebo v nejlepším případě jeví neurčité třepavé pohyby a fertilizace bez ICSI je zcela nemyslitelná. Důležitou výhodou TESE je její opakovatelnost. Lze odebrat mnoho testikulárních biopsií bez větších těžkostí pro pacienta. Embrya pocházející z fertilizace testikulární spermií lze zamrazit a uchovat. Jejich morfologický vzhled se neliší od zamrazených embryí vzniklých klasickou IVF.

Vzhledem k tomu, že u pacientů s azoospermii je prokazována až 21% přítomnost chromozomálních abnormalit, je znovu nutno zdůraznit nutnost genetického vyšetření ještě před zahájením terapie. Pokud na základě genetického vyšetření není pro vysoké riziko přenosu vrozených vývojových vad vhodné použít gamety pacienta, zůstává jako ultimum refugium použití spermií donora. Problematika dárcovství gamet byla v naší literatuře uvedena nedávno [12].

---

## ZÁVĚR

---

Účinnost metod MESA nebo TESE v kombinaci s ICSI byla prokázána v případech obstrukční i neobstrukční azoospermie. MESA je nepostradatelná v případech inoperabilní obstrukce vývodných cest semenných. Její hodnota byla výrazně zvýšena rozvojem metod asistované reprodukce, především zavedením intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI). TESE je pak bez ICSI zcela nemyslitelná.

Normální fertilizace při kombinaci technik ICSI a MESA nebo TESE u extrémních oligoastenoteratozoospermii a azoospermii ukazují, že lze pomoci na prosté většině infertilních mužů.

---

## LITERATURA

---

1. Dubin, L., Amelar, R. D.: Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil. Steril.*, 22, 1971, s. 469 - 474.
2. Ventruba, P., Žáková, J., Crha, I., Němcová, S.: Intracyto-plazmatická injekce spermie do oocytu a asistovaný hatching - mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. *Praktická gynekologie*, 1, 1997, s. 14 - 25.
3. Temple-Smith, P. D., Southwick, G. J., Yates, C. A., Trounson, O., de Kretser, D. N.: Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J. In Vitro Fertil Embryo Transf.*, 2, 1985, s. 119 - 122.
4. Turner, T. T.: On the development and use of alloplastic spermatoceles. *Fertil. Steril.*, 49, 1988, s. 387 - 395.
5. Stern, R. C., Boat, T. F., Doershuk, C. F.: Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis syndrome. *Lancet*, 1982, No. 2, s. 1401 - 1403.
6. Dumur, V., Gervais, R., Rigot, J. N., Lafitte, J. J., Nanouvrier, S., Biserte, J. et al.: Abnormal distribution

- of CF F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens [letter]. *Lancet*, 1990, No. 2, s. 512.
7. **Patrizio, P., Ord, T., Silber, S. J., Asch, R. H.:** Correlation between epididymal length and fertilization rate in men with congenital absence of the vas deferens. *Fertil. Steril.*, 61, 1994, s. 265 - 268.
  8. **Asch, R. H., Patrizio, P., Silber, S. J.:** Ultrastructure of human sperm in men with congenital absence of the vas deferens: clinical implications. *Fertil. Steril.*, 58, 1992, s. 190 - 193.
  9. **Schoysman, R., Vanderzwalmen, P., Nijs, N.:** Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*, 342, 1993, s. 1237.
  10. **Jow, V. H., Steckel, J., Schlegel, P. N., Nagid, N. S., Goldstein, N.:** Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J. Androl.*, 14, 1993, s. 194 - 198.
  11. **Cooper, T. G.:** In defense of a function for the human epididymis. *Fertil. Steril.*, 54, 1990, s. 965 - 975.
  12. **Crha, I., Ventruba, P., Žáková, J., Mardešič, T.:** Dárcovství gamet - etické, legální a technické aspekty. *Čes. Gynekol.*, 62, 1997, s. 16 - 19.
  13. **Crha, I., Ventruba, P., Žáková, J., Pacík, D., Turjanica, N.:** Azoospermia treatment by ICSI and MESA or TESE. In: Xth World Congress on In Vitro Fertilization and assisted reproduction. Moduzzi Editore, Bologna, 1997, v tisku.

*Doc. MUDr. D. Pacík*  
*Urologická klinika FNŠP*  
*Jihlavská 20*  
*639 00 Brno - Bohunice*

### *Vážení čtenáři,*

redakce časopisu ACTA CHIRURGIAE PLASTICAE, který vychází v anglickém jazyce, sděluje, že pro větší přístupnost českým lékařům se rozhodla uveřejňovat obsáhlejší souhrny článků v češtině.

Jde o mezinárodní časopis s téměř čtyřicetiletou tradicí, vycházející čtyřikrát do roka. Každé číslo obsahuje cca sedm článků s aktuální tematikou z oboru plastické, estetické a rekonstrukční chirurgie, kranio-maxilofaciální chirurgie, chirurgie ruky a popáleninové medicíny. Významný je podíl studií o využití moderních mikrochirurgických metod a prací zabývajících se problematikou kraniofaciálních malformací, zejména obličejových rozštěpů. Vedle původních a přehledných prací jsou publikovány také kasuistiky, inovace, komentáře, zprávy z kongresů a recenze knih. Časopis je určen chirurgům příslušných a blízkých oborů, popálenináře, dermatology, stomatology a všichni, kteří se zabývají léčbou a výzkumem vrozených vad hlavy a krku.

Publikovány jsou nejen klinické, ale i experimentálně a teoreticky zaměřené studie z uvedených a příbuzných disciplín. Protože základem rozvoje lékařské praxe a výzkumu je spolupráce a vzájemná informovanost, časopis uveřejňuje příspěvky nejen ze střeoevropského regionu, ale ze všech částí světa, a to zpravidla v půlročním horizontu. Titul je excerptován v Excerpta Medica-EMBASE, Index Medicus-MEDLINE a Biological Abstracts.

Od roku 1994 vychází časopis ve formátu A4 s plnobarevnou fotodokumentací, která je publikována bez příplatku ze strany autorů.

Předplatné časopisu pro rok 1997 činí 176,-Kč, resp. 248,-Sk.

Přijímáme rovněž předplatitele ze zahraničí, pro něž předplatné pro rok 1997 činí DM 140,-, resp. USD 96,- vč. poštovního.

Příhlášky můžete zasílat na adresu:

*Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP,*  
*Sokolská 31, 120 26 Praha 2,*  
*fax 02 - 249 11 420.*



# **PUBLIKACE VII**

# Retrográdní ejakulace – jedna z příčin mužské neplodnosti

E. Lousová, J. Žáková, R. Beharka, P. Ventruba, D. Pacík, H. Pochopová

**Souhrn:** Úvod: Retrográdní ejakulace je neobvyklá příčina neplodnosti. Postihuje přibližně 2% mužů. V případě azoospermie by se měla vyloučit nebo potvrdit vyšetřením moči po ejakulaci. Cílem práce bylo najít metodu získání a přípravy spermií pro oplozování in vitro. **Materiál a metodika:** Po alkalizaci moči, masturbaci a vymočení byla moč centrifugována a zpracována metodou swim-up. **Výsledky:** U 1 pacienta byly postupně ze 3 odběrů získány spermie, které byly zamrazeny. Po oplozování 9 oocytů metodou ICSI byla 2 embrya vhodná k transferu. **Závěr:** Použitá technika je jednou z možností získání spermií u mužů s kompletní retrográdní ejakulací.

**Klíčová slova:** retrográdní ejakulace - spermie - azoospermie - asistovaná reprodukce

**Summary:** Retrograde ejaculation – one of the causes of male infertility. **Introduction:** Retrograde ejaculation is a rare cause of male infertility. About 2% of men are affected by it. In the case of azoospermia, it should be confirmed or excluded by the post-ejaculatory urine test for spermatozoa. The objective of this study was to find a method for the recovery and preparation of spermatozoa for in vitro fertilisation. **Material and method:** Urine was centrifuged and processed using the swim-up after urine alkalisation, masturbation and urination. **Results:** Spermatozoa were obtained and cryopreserved from three successive collections performed in one patient. After fertilisation of 9 oocytes with the ICSI method, 2 embryos were suitable for embryotransfer. **Conclusion:** The above technique represents a chance for the recovery of spermatozoa in men with complete retrograde ejaculation.

**Key words:** retrograde ejaculation - spermatozoa - azoospermia - assisted reproduction

## Úvod

Mužská neplodnost se podílí na neplodnosti páru zhruba 40 až 50% a podle mnoha studií její podíl výrazně stoupá. Kromě špatných hodnot spermogramu má na fertilitu muže vliv aktuální zdravotní stav, urogenitální infekce, varikokéla, poškození chlamydiových a další faktory ovlivňující tvorbu spermií. V případě nálezu azoospermie je třeba pomýšlet na možnost retrográdní ejakulace.

Jedná se o stav, při kterém je semeno při orgasmu vstříknuto opačným směrem do močového měchýře. Příčina je multifaktoriální a může být vrozená, získaná nebo neznámého původu. Postihuje přibližně 2% mužů. Mezi nejčastější příčiny patří ochabnutí nervů ve svaly, který za normálních okolností uzavře v průběhu ejakulace vstup do močového měchýře. Často se vyskytuje u mužů po prodělaném poranění páteře, po prostatektomii, u mužů s diabetem, roztroušenou sklerózou nebo po radikálním odstra-

nění lymfatických uzlin v důsledku testikulárního tumoru [2,3].

U malé skupiny mužů není příčina retrográdní ejakulace známá.

Retrográdní ejakulaci je možno prokázat vyšetřením moči po ejakulaci.

Spermie nalezené v moči jsou většinou nepohyblivé, neboť nízké pH, osmotický tlak a toxicita moče na ně působí spermicidně.

Vzhledem k tomu, že chirurgické a lékařské terapie nebyly úspěšné, hledaly se alternativní možnosti, jak získat nepoškozené spermie z moče. Důležitá je alkalizace moče, která může být prováděna různými metodami. Buď metodou, kterou popisujeme níže, nebo ústní formou. Pacient přijímá zařovací sodu večer před výkonem a v den odběru. Před odběrem se vymočí. Po ejakulaci se opět vymočí a vzorek odevzdá do laboratoře k následnému zpracování [1].

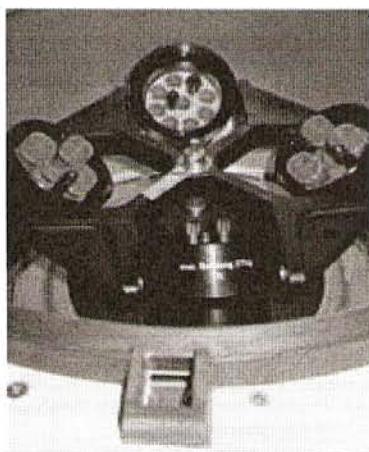
Cílem práce bylo najít metodu získání a přípravy spermií pro oplozování in vitro.

## Materiál a metodika

K získání spermií se přistupuje po 3-4denní sexuální abstinenci pacienta. Pacient se před zákrokem prvně vymočí a poté je provedena alkalizace moče. Nejdříve je šetrně zaveden katétr do močového měchýře a provede se jeho opakovaný proplach Ringerovým laktátem. Následně se močový měchýř naplní 150-200 ml Ringerova laktátu, který v močovém měchýři upraví prostředí. Pacient je odeslán do odběrové místnosti. 10 min po suché ejakulaci se pacient vymočí do sterilní sběrné láhve a moč odevzdá do laboratoře.

Získaná moč se rozdělí do zkumavek o objemu 15 ml a centrifuguje se 5 min při 3 000 otáček. Sediment se přenesení do 5 ml zkumavek a resuspenduje v promývacím médiu. Po 5 min centrifugace při 1 500 otáčkách se supernatant odstraní a zbylá peletka se převrství 100 µl IVF média. Po hodinové inkubaci v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C jsou spermie připraveny





Obr. 1. Centrifugace.

k použití pro oplozování nebo kryokonzervaci.

### Výsledky

Pacient (41 let), tumor testis, po lymfadenektomii retrográdní ejakulace. U pacienta byly provedeny s časovým odstupem 1 měsíce 3 odběry moči se spermii, vždy s nálezem ojedinělých spermií s minimálním počtem pohyblivých. Po zpracování bylo zamraženo celkem 8 dávek spermií. Partnerka



Obr. 2. Intracytoplazmatická injekce spermie do oocyty.

podstoupila proceduru fertilizace in vitro včetně embryu transferu. V den odběru oocytů byly všechny dávky spermií rozmrazeny. Získané spermie byly pouze nepohyblivé. Oplozování 9 oocytů proběhlo metodou intracytoplazmatické injekce spermie do vajíčka (ICSI). Oploženo bylo 7 oocytů a 4. den kultivace byla transferována 2 embrya ve stadiu moruly. K otěhotnění nedošlo.

### Diskuse

Zpětná ejakulace může postihovat až 2% neplodných mužů a vyskytuje se až u 16% mužů s azospermii. Proto je třeba v případě zjištěné azospermie vždy nutně vyšetření močového sedimentu na přítomnost spermií.

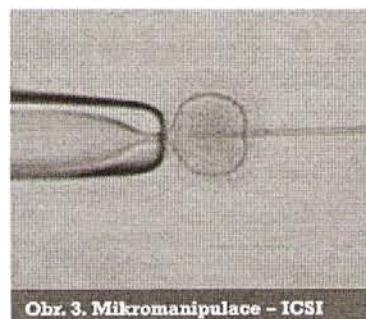
V klasické formě zpětné ejakulace není ejakulát vůbec produkován. Nicméně v některých případech ejakulát může být produkován s nálezem azospermie. Zvláště pokud je ejakulátu velmi malé množství (0,1–0,2 ml), je třeba na tuto možnost myslet, s největší pravděpodobností se jedná pouze o sekret bulbo-uretrálních žláz [1].

Léčba zpětné ejakulace je možná, ale výsledky byly málo úspěšné a s rizikem návratu. Jedná se např. o chirurgickou úpravu močového měchýře nebo podávání anticholinergik.

Alkalizace moči se dá provést různými metodami. Buď metodou, kterou zde popisujeme nebo podáním sodium bikarbonátu a vody perorálně [4].

### Závěr

Tato technika otevírá prostor pro léčbu mužů s kompletní retrográdní ejakulací metodami asistované reprodukce, tedy bez chirurgických zákroků. Úspěch získání životaschopných spermií z moči



Obr. 3. Mikromanipulace – ICSI

je závislý na vyloučení působení kyselého prostředí moči na spermie, resp. na bezpečné regulaci pH a osmolarity moči v době ejakulace.

### Literatura

1. Nikolettos N, Al-Hasani S, Baukloh V et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with retrograde ejaculation. Hum Rep 1999; 9: 2293–2296.
2. Gerris J, Royen E, Mangel-Schots K et al. Andrology: Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of metaphase II oocytes with spermatozoa from a man with complete retrograde ejaculation. Hum Rep 1994; 7: 1293–1296.
3. Yavetz H, Yogev L, Hauser R et al. Retrograde ejaculation. Hum Rep 1994; 3: 381–386.
4. Check JH, Bollendorf AM, Press MA et al. Noninvasive techniques for improving fertility potential of retrograde ejaculates. Arch Androl; 25: 271.

Doručeno do redakce: 4. 1. 2008  
Přijato po recenzi: 12. 2. 2008

Eva Lousová<sup>1</sup>  
RNDr. Jana Žáková, Ph.D.<sup>1</sup>  
MUDr. Rastislav Beharka<sup>2</sup>  
prof. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.<sup>1</sup>  
prof. MUDr. Dalibor Pacík, CSc.<sup>2</sup>  
Hana Pochopová<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Gynekologicko-porodnická klinika FN a MU Brno  
<sup>2</sup> Urologická klinika FN a MU Brno



## **PUBLIKACE VIII**

# Assisted hatching. Results in women with repeated embryotransfer failure

J. ŽÁKOVÁ, P. VENTRUBA, J. ADLER \*  
and S. NĚMCOVÁ

*1st Clinic of Gynecology and Obstetrics, Brno, Czech Republic*

*\*Institute of Biology, Faculty of Medicine, Brno, Czech Republic*

IX World Congress on  
IN VITRO  
FERTILIZATION and  
ALTERNATED  
ASSISTED  
REPRODUCTION

Vienna, Austria  
3-7 April 1995

## SUMMARY

The creating of artificial opening of the zona pellucida before the transfer (Assisted Hatching) can help the blastocyst to escape from the zona and to nidate.

An artificial slot in the zona of 38 embryos at 14 patients was created. Transfer of maximally three embryos was done from 1 to 3 hours after micromanipulation. 5 clinical pregnancies were reached (35.7% pregnancy rate). Three of them were women from three to seven unsuccessful transfers.

According to preliminary results, the method of assisted hatching will be added to the classic IVF, mainly in women with repeated unsuccessful transfers.

## INTRODUCTION

One reason of the low implantation rate after IVF/ET is the limiting ability of blastocyst to escape from the zona pellucida (ZP), and to nidate. To this procedure the creating of artificial opening of the zona before the transfer (Assisted Hatching) can help.

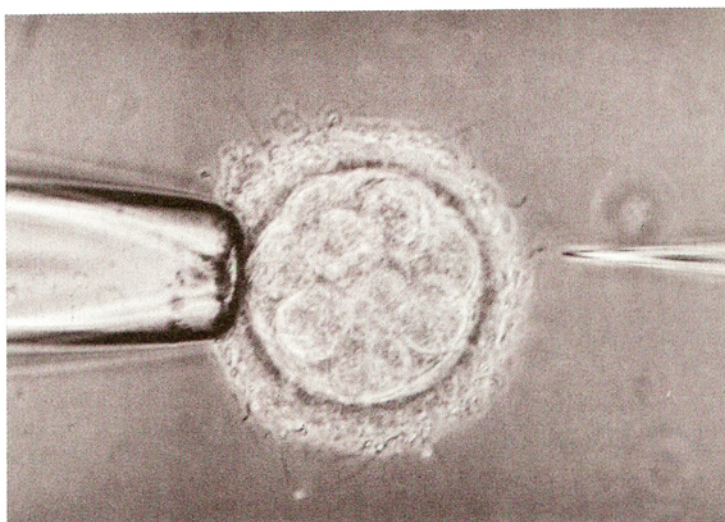
The aim of this work was to evaluate our experience and IVF/ET results after mechanically performed hatching at the embryos before the transfer.

## MATERIAL AND METHODS

Our group contained 14 patients. Ovarian follicular development was stimulated by hMG, FSH, or by both ( Pergonal, Metrodin, fa Serono ).Oocytes were recovered by transvaginal ultrasound - guided follicular puncture and aspiration at 36 - 38 h after the administration of hCG (Ventruha et al., 1990). Till the reaching of 4 - cell embryo the cultivation passed at 37°C in the atmosphere 5 % CO<sub>2</sub> in air in the Earles medium (Serva). Then the cultivation was prolonged in M3 medium (Medicult ). Spermatozoa for insemination were prepared by the centrifugation and the swim-up method.

At embryos suitable for transfer after 72 h of cultivation, assisted hatching (AH) was performed. Procedures were performed using Leitz Fluovert microscope and Narishige micromanipulators. Micropipettes were made at our workplace by using a puller, microforge and microgrinder (Narishige). After the embryo catching by holding micropipette the artificial slot was performed by moving the glass needle through the zona pellucida and then against the holding micropipette ( Žáková et al., 1994 ).

The transfer of maximally three embryos was done from 1 to 3 hours after micromanipulation.



## RESULTS AND CONCLUSIONS

From the total number of 38 micromanipulated embryos 30 (i.e. 78.9 %) were at the eight - and more-cell stage. The other embryos were 4 - 6-cell stage. An embryo was damaged only in one case.

37 preimplantation embryos were transferred. In 9 cases these were 3 embryos, and in 5 cases two embryos after assisted hatching.

From 14 embryotransfers 5 clinical pregnancies were reached ( 35.7 % pregnancy rate - PR ). Important fact is that three of them were women from three to seven unsuccessful transfers at various IVF centres.

Our results have shown that AH increased markedly the success of embryotransfers ( 35.7 % PR ) if compared with classic IVF / ET, which corresponds to the data given in literature. Cohen et al. (1990, 1991) has shown



**Table 1:** Assisted Hatching: 1994 Results

Ist Clinic of Gynaec. Obstet., Masaryk University, Brno, Czech Republic

No. of patients	14
No. of ET	14
No. of embryos with AH	38
No. of transferred embryos	37
No. of clinical pregnancies	5
Clinical pregnancy rate (%)	35.7

the AH to be the most effective in embryos with the thickened zona, in women over 38 years of age and in the cases with increased FSH. Similarly, other authors mention the positive influence of the zona pellucida disturbance on the success of implantation. Malter and Cohen (1989) have observed that the embryos with artificial fissure start hatching earlier than the controls. Liu et al. (1993) has also reported on the AH role in the acceleration of implantation in patients after IVF. The presence of an artificial opening in the ZP can increase the embryo implantation not only in a mechanical way by making the process of hatching easier, but also by mediating an earlier contact between an embryo and endometrium. This contact can increase the developmental potential of an embryo and optimize the embryo and endometrium synchronization, which leads to speeding up the implantation.

According to our preliminary results, the method of assisted hatching will be added to the classic IVF, mainly in women with repeated unsuccessful transfers.

#### REFERENCES

- COHEN, J., ELSNER, C., KORT, H., MALTER, H., MASSEY, J., MAYER, M.P. and WEIMER, K.: Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Human Reprod.*, 5, 7 - 13, 1990
- COHEN, J.: Assisted hatching of human embryos. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 8, 179 - 190, 1991
- LIU, H., COHEN, J., ALIKANI, M., NOYES, N., ROSENWAKS, Z.: Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil. Steril.*, 5, 871 - 875, 1993
- MALTER, H., COHEN, J.: Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res.*, 24, 67 - 80, 1989
- VENTRUBA, P., ČUPR, Z., VESELÝ, J., REJDOVÁ, I., ŽÁKOVÁ, J.: Transvaginální odběr oocytů pod kontrolou vaginální sonografie 1987 - 1990. *Gynekolog*, 1, 5 - 7, 1992
- ŽÁKOVÁ, J., VENTRUBA, P., NĚMCOVÁ, S., ADLER, J.: IVF results following assisted hatching. In: *Novinky ze Sekce asistované reprodukce ČGPS*, 4, 11 - 12, 1994

IX World Congress on  
IN VITRO  
FERTILIZATION and  
ALTERNATED  
ASSISTED  
REPRODUCTION

Vienna, Austria  
3-7 April 1995

## **PUBLIKACE IX**

## MIKROMANIPULACE V OBLASTI ZONA PELLUCIDA EMBRYA: ASISTOVANÝ HATCHING 1994 - 1995

*Micromanipulation in the Zona Pellucida Area: Assisted Hatching of Human Embryos 1994 - 1995*

P. Ventruba, J. Žáková, J. Adler, I. Crha, P. Trávník

I. gynek. - porod. klinika LF MU, Brno, přednosta doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.

*In the period from March 1994 to December 1995 were performed 41 embryo transfers after assisted hatching (AH) at the First Clinic of Gynecology and Obstetrics, Masaryk University Brno. 91 embryos from the number of 122 micromanipulated embryos (74.6%) were in the eight- and more cells stage. 11 clinical pregnancies were reached (26.8% pregnancy rate).*

*Our experience certifies the necessity of preclinical training for introducing of micromanipulation techniques into the clinical practice.*

*We have not found any decrease of pregnancy rate per transfer caused by the reduction of maximal number of transferred embryos from four to three.*

*Assisted hatching has increased the success rate of pregnancies per transfer of 8% with comparison to our routine IVF results. We recommend to provide AH at women with previous failure of two good quality embryo transfers.*

Metody léčby neplodnosti člověka pokročily v posledních pěti letech od asistované reprodukce s optimalizací oplození in vitro k vlastní manipulaci s gametami a embryi pomocí mikromanipulačních technik. Některé metody již daly první uspokojivé výsledky a jsou i eticky přijatelné.

Mikromanipulace v oblasti zona pellucida (ZP) zahrnují metody asistované fertilizace (AF) a asistovaného uvolnění embrya ze zona pellucida - asistovaný hatching (AH).

Asistovaná fertilizace se využívá zejména při léčbě androglického faktoru a zahrnuje (1) perforaci zona pellucida - ZD (zona drilling) a (2) parciální disekci zony - PZD pro usnadnění penetrace spermií, (3) SUZI - subzonální inseminaci a (4) ICSI - intracytoplasmatickou injekci spermií [13].

Asistovaný hatching se může provádět (a) mechanicky - perforací nebo nařiznutím ZP využitím mikromanipulačního zařízení, (b) chemicky - částečnou destrukcí ZP snížením pH, např. kyselým Tyrodovým roztokem nebo (c) laserovým mikropaprskem [11]. Cílem AH je ulehčit uvolnění embrya ze zona pellucida a zvýšení jeho implantační schopnosti. Vychází z hypotézy, že kultivace in vitro negativně ovlivňuje průběh hatchingu a větší procento fyziologicky se vyvíjejících embryí není schopné během expanze blastocysty opustit ZP a implantovat [1].

Klinické využití AH bylo vedeno zjištěním, že děličí se embrya s dobrou prognózou implantace s velkou pravděpodobností produkují aktivní komponentu, která redukuje tloušťku zony, zřejmě jako přípravu na

hatching [8]. Bylo pozorováno, že embrya vzniklá po mikromanipulačně provedené fertilizaci, a tedy s arteficiálně vytvořeným otvorem v zoně, vykazují vyšší poměr implantace [2].

Naše sdělení se zabývá mechanicky prováděným asistovaným hatchingem u embryí před transferem do dělohy a hodnotí dosažené výsledky na I. gynek. porod. klinice v Brně v letech 1994 - 1995. Jde o součást řešení grantového úkolu MZ ČR č. 1821-2: "Mikromanipulace v oblasti zona pellucida zvyšující úspěšnost oplození a transferu embrya".

### Materiál a metodika

#### 1. Preklinická část

Nácvik byl zahájen na podzim 1993 na mikromanipulačním zařízení, skládajícím se z mikroskopu Leitz Fluovert a mechanických mikromanipulátorů Narishige. V první fázi jsme začali s přípravou mikropipet. Mikropipety byly vyráběny ze skleněných neheparinovaných kapilár vytažením na horizontálním a později na vertikálním tahači. Dalším opracováním na mikrovármě a brusce (vše firma Narishige) bylo dosaženo konečného tvaru buď držící, operační či injekční mikropipety.

Dlouhodobý a opakovaný nácvik mikromanipulace spočíval v uchopování neoplozených a degenerovaných oocytů držící mikropipetou a mechanickým narušováním zona pellucida operační mikropipetou. Pohybem operační mikropipety proti mikropipetě držící oocyt byl vytvořen arteficiální otvor.

#### 2. Klinická část

Od března 1994 jsme začali provádět AH u pacientek z programu IVF/ET [15, 20, 21, 23]: Soubor zahrnuje 41 pacientek, 18 žen v roce 1994 (soubor 1) a 23 žen v roce 1995 (soubor 2). Folikulární vývoj byl stimulován gonadotropiny (Pergonal Sero, Humegon Organon, Metrodin Sero) v dávce 150 - 225 IU/den. Ovariální hyperstimulace probíhala od 3. dne menstruačního cyklu s monitorováním 17-beta estradiolu (E2), LH a ultrazvukové folikulometrie. Po dosažení adekvátní ovariální odpovědi byla maturace oocytů indukována 9000 j. lidského choriového gonadotropinu (hCG - Praedyn Spofa, Profasi Sero, Pregnyl Organon). Za 36 hod. po aplikaci hCG byl proveden transvaginální odběr oocytů pod kontrolou UZ.

Spermiie byly pro inseminaci připraveny metodou centrifugace a swim up. Kultivace probíhala v Earlově médiu (Serva) obohaceném o 15 % pupečnickového séra a po 48 hod. v M3 médiu (Medi-Cult) v kultivačním boxu (Heraeus) při 37°C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> ve



vzduchu. Po 72 hodinách kultivace byl u embryí vhodných k transferu proveden asistovaný hatching.

Narušení zona pellucida bylo provedeno na výše popsaném mikromanipulačním zařízení. Používané mikropipety byly vyrobeny na našem pracovišti. Arteriální štěrbinová byla vytvořena parciální disekcí ZP po přichycení embrya držící mikropipetou. Průnik operační mikropipety skrz zonu byl veden bez kontaktu s blastomerami.

V roce 1994 byla transferována maximálně čtyři embrya, v roce 1995 maximálně tři embrya. Embryotransfer (ET) byl prováděn v době 1 až 3 hodiny po mikromanipulaci [22].

## Výsledky

### 1. Preklinické výsledky

V průběhu 3 měsíců byla zvládnuta metoda přípravy mikropipet a způsob práce s mikromanipulátorem. Na neoplozených oocytech byl nacvičen způsob fixace oocytu, průnik mikropipety přes zonu pellucida a do cytoplasmy, stejně jako různé způsoby ztenčování zona pellucida.

Byly otestovány způsoby přípravy spermií pro subzonální a intracytoplasmatickou injekci spermie. Rovněž byly vypracovány metody kontroly výsledků mikromanipulace pomocí transmisního a rastrovacího elektronového mikroskopu [12, 16].

### 2. Klinické výsledky

V období březen 1994 - prosinec 1995 byl proveden asistovaný hatching u 41 pacientek. Indikací byly zejména případy, kdy po opakovaných transferech 3 až 4 kvalitních embryí nedošlo k otěhotnění.

#### 2.1. Soubor 1 - 1994

V roce 1994 bylo provedeno 18 výkonů. Z 60 embryí určených pro mikromanipulaci bylo transferováno 59 preimplantačních embryí, tj. 98,3 % embryí po provedeném hatchingu.

V 10 případech byla transferována čtyři embrya, 3 pacientkám tři a 5 ženám byla transferována dvě mikromanipulovaná embrya. Z 18 provedených ET jsme dosáhli 5 klinických těhotenství, tj. 27,8 % klinických těhotenství / ET.

#### 2.2. Soubor 2 - 1995

V roce 1995 byl asistovaný hatching proveden 23 pacientkám. Všechny 62 embryí, u kterých byl AH proveden, bylo transferováno. V 16 případech byla transferována tři a v 7 případech dvě mikromanipulovaná embrya.

Z 23 provedených ET jsme dosáhli 6 klinických gravidit, tj. 26,1 % klin. těhotenství.

#### 2.3. Asistovaný hatching 1994 - 1995

Celkem bylo provedeno 41 transferů embryí po asistovaném hatchingu. Ze 122 embryí určených pro mikromanipulaci bylo 91 embryí (74,6 %) ve stádiu osmi- a vícebuněčném. Zbývající embrya byla čtyř- a šestibuněčná. Během mikromanipulace došlo pouze u jednoho embrya k poškození zona pellucida se spontánní expulzí blastomer. Celkem bylo transferováno 121 preimplantačních embryí, tj. 99,2 % embryí po

provedeném hatchingu. Pacientkám byla transferována v 10 případech čtyři, v 19 případech tři a ve 12 případech dvě mikromanipulovaná embrya.

Z 41 provedených embryotransferů (soubor 1+2) jsme dosáhli 11 klinických těhotenství, tj. 26,8 % klinických těhotenství na ET. V šesti případech otěhotněly pacientky, které za sebou měly již 3 nebo 4 neúspěšné transfery, a to nejen na našem pracovišti (tab. 1).

#### 2.4. Klasická IVF

Kontrolní soubor představovalo 80 po sobě jdoucích pacientek ve sledovaném období s provedenou klasickou IVF. Kultivace probíhala stejným způsobem v Earlově médiu a M3 médiu. Z 54 provedených ET bylo dosaženo 10 klinických gravidit (18,5 % klinických těhotenství / ET).

Srovnání výsledků klasické IVF s IVF a AH prokázalo zvýšení úspěšnosti o více než 8 % dosažených klinických těhotenství na transfer ( $p > 0,05$ ).

Tab. 1. Asistovaný hatching - výsledky na I. gynekologicko-porodnické klinice Brno

	IVF (kontrola)	IVF + AH		
		1994	1995	1994+95
Pacientky	80	18	23	41
ET	54	18	23	41
Embrya s provedeným AH	0	60	62	122
Transferovaná embrya	164	59	62	121
Prům. počet embryí/ET	3,0	3,3	2,7	3,0
Klinické těhotenství	10	5	6	11
Klin. tēhot. / ET (%)	18,5*	27,8	26,1	26,8*

\*  $p < 0,01$

V tab. 2 rozebíráme dosažené výsledky AH v závislosti na počtu transferovaných embryí. Prokázali jsme, že i když jsme v roce 1995 snížili maximální počet transferovaných embryí na tři, nedošlo ke snížení úspěšnosti dosažených těhotenství na ET.

Tab. 2.: Asistovaný hatching - závislost úspěšnosti ET na počtu transferovaných embryí

		Počet transferovaných embryí				
		1	2	3	4	1-4
1994	počet ET	0	5	3	10	18
	počet gravidit	-	0	1	4	5
	klin. grav./ET (%)	-	0,0	33,3	40,0	27,8*
1995	počet ET	0	7	16	0	23
	počet gravidit	-	2	4	-	6
	klin. grav./ET (%)	-	28,6	25,0	-	26,1*
1994-1995						
	počet embryí	0	24	57	40	121
	počet ET	0	12	19	10	41
	počet gravidit	-	2	5	4	11
	klin. grav./ET (%)	-	16,7	26,3	40,0	26,8*

\*  $p < 0,01$



### Diskuse

Khalifa a spol. uvádí, že jednak stimulace a jednak suboptimální kultivační podmínky in vitro způsobují ztlustění zona pellucida [7]. Wright a spol. demonstrovali, že tloušťka zona pellucida souvisí se stádiem embrya a počtem blastomer. Ztlustění ZP snižuje schopnost blastocysty uvolnit se ze zona pellucida a následně nidovat, a tím ovlivňuje implantační poměr po IVF/ET [17].

Cohen se spol. prokázal, že asistovaný hatching je neefektivnější u embryí se ztlustělou zona pellucida na více než 16 um. Tyto embrya mají obecně sníženou implantační schopnost. Selektivní AH se jeví úspěšný i u žen ve věku nad 38 roků a u případů se zvýšeným FSH [3]. Přesto však musíme být opatrní v závěru, že věk, bazální FSH a fyzikální nebo chemické změny na zona pellucida spolu souvisí.

Rovněž další autoři prokázali pozitivní vliv narušení ZP pro úspěšnost implantace. Malter s Cohenem pozorovali, že embrya s arteficiální štěrbinou zahajují hatching dříve než kontrolní [9]. Liu a spol. uvádějí, že AH napomáhá zrychlení implantace u pacientek po IVF. Mechanismus však není zcela jasný [8]. Přítomnost arteficiálního otvoru v ZP může zvyšovat implantaci embryí nejen mechanicky usnadněným procesem hatchingu, ale také tím, že dojde ke zprostředkování časného kontaktu embrya s endometriem. Tento kontakt může zvýšit vývojový potenciál embrya a optimalizovat synchronizaci mezi embryem a endometriem, což vede ke zrychlení implantace [4, 6].

Podle našich zkušeností můžeme konstatovat, že pro zavedení mikromanipulačních technik je důležité nejprve zvládnout časově i manuálně náročnou preklinickou přípravu. Je nezbytné nabýt určité praktické zkušenosti s mikromanipulací na neoplozených oocytech a teprve potom přistoupit k provádění vlastních technik v klinické praxi.

První klinické zkušenosti s asistovaným hatchingem v České republice prokázaly výrazné zlepšení výsledků klasické IVF/ET [10, 15, 18, 20, 22]. V naší i slovenské literatuře již bylo referováno o prvních úspěšně dokončených těhotenstvích po asistované fertilizaci, jmenovitě po SUZI a PZD [5, 19]. Národní registr asistované reprodukce uvádí, že v roce 1994 byl asistovaný hatching nejčastější mikromanipulační technikou v ČR. Ze 114 výkonů, což bylo 5 % všech léčebných ART cyklů, bylo dosaženo 36 klinických gravidit, tj. 31,6 % těhotenství na transfer. Ukazuje se, že úspěšnost mikromanipulačních technik v mnoha směrech předčí výsledky klasických postupů (ČR - klasická IVF/ET: 15,6 % klin. těhotenství / transfer v roce 1993, resp. 17,7 % v roce 1994). V roce 1994 byly provedeny i první injekce spermií do cytoplazmy oocyty (ICSI), stejně jako mechanické nařiznutí zona pellucida mikrojehlou [14].

### Závěr

1. Zavedení mikromanipulačních technik do klinické praxe vyžaduje preklinickou přípravu. Je nezbytné

nabýt praktické zkušenosti na neoplozených oocytech a teprve potom přistoupit k provádění vlastních technik.  
2. V období březen 1994 - prosinec 1995 bylo provedeno 41 transferů embryí po AH a dosaženo 26,8% klinických těhotenství.  
3. Srovnání výsledků klasické IVF a IVF+AH prokázalo zvýšení úspěšnosti o více než 8 % dosažených klinických těhotenství na transfer po AH ( $p < 0,05$ ).  
4. Prokázali jsme, že při snížení maximálního počtu transferovaných embryí na tři nedošlo ke snížení pravděpodobnosti otěhotnění.  
5. Asistovaný hatching doporučujeme provádět u žen, které neotěhotněly po 2 kvalitních embryotransferech.

Práce je součástí řešení grantu IGA č. 1821-2 MZ ČR.

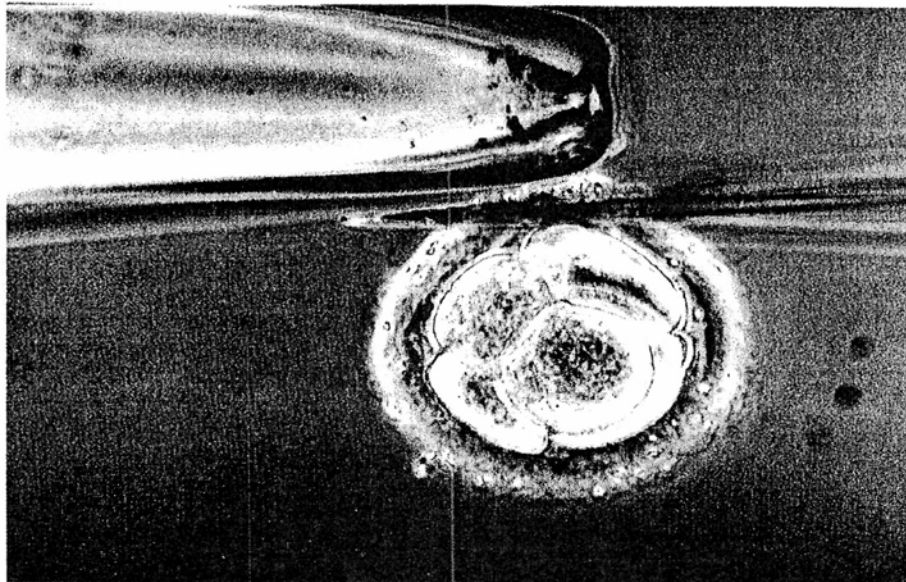
### LITERATURA

1. Cohen, J.: Assisted hatching of human embryos. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 8, 1991, s. 179 - 190.
2. Cohen, J. et al.: Rescue of human embryos by micromanipulation. *Bailliere s Clin. Obstet. Gynecol.*, 8, 1994, s. 95 - 116.
3. Cohen, J. et al.: Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Human Reprod.*, 5, 1990, s. 7 - 13.
4. Edwards, R.G., Brody, S.A.: *Principles and Practice of Assisted Human Reproduction*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1995, s. 692.
5. Herman, M., Hlinka, D.: Porod zdravého dítěte po subzónální inseminaci oocytů v programu IVF. *Slov. Gynek.*, 2, 1995, s. 21 - 22.
6. Hlinka, D.: Použití mikromanipulačních metod v humánní asistované reprodukci. *Slov. Gynek.*, 2, 1995, s. 18 - 21.
7. Khalifa, E. et al.: Crude thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Human Reprod.*, 7, 1992, s. 532 - 536.
8. Liu, H. et al.: Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil. Steril.*, 60, 1993, s. 871 - 875.
9. Malter, H., Cohen, J.: Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res.*, 24, 1989, s. 67 - 80.
10. Mardašič, T. a spol.: Faktory ovlivňující výsledky in vitro fertilizace - IV. Význam stimulačních protokolů kombinujících analoga GnRH a hMG u žen neúspěšně stimulovaných kombinací klomifencitrát - hMG. *Čes. Gynek.*, 60, 1995, s. 74 - 78.
11. Strohmer, H., Feichtinger, W.: Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.*, 58, 1992, s. 212 - 214.
12. Trávník, P. a spol.: Mikromanipulační techniky v oblasti zona pellucida. *Asistovaná reprodukce*, 3, 1993, s. 13 - 14.
13. Van Steirteghem, A. et al.: Intracytoplasmatic sperm injection. *Bailliere s Clin. Obstet. Gynecol.*, 8, No. 1, 1994, s. 85 - 93.
14. Ventruba, P.: Registr asistované reprodukce v České republice: výsledky roku 1994. *Asistovaná reprodukce*, 5, 1995, 2, s. 4 - 22.
15. Ventruba, P. a spol.: The effects of prolonged cultivation and assisted hatching on improving IVF results. *Contracept.*

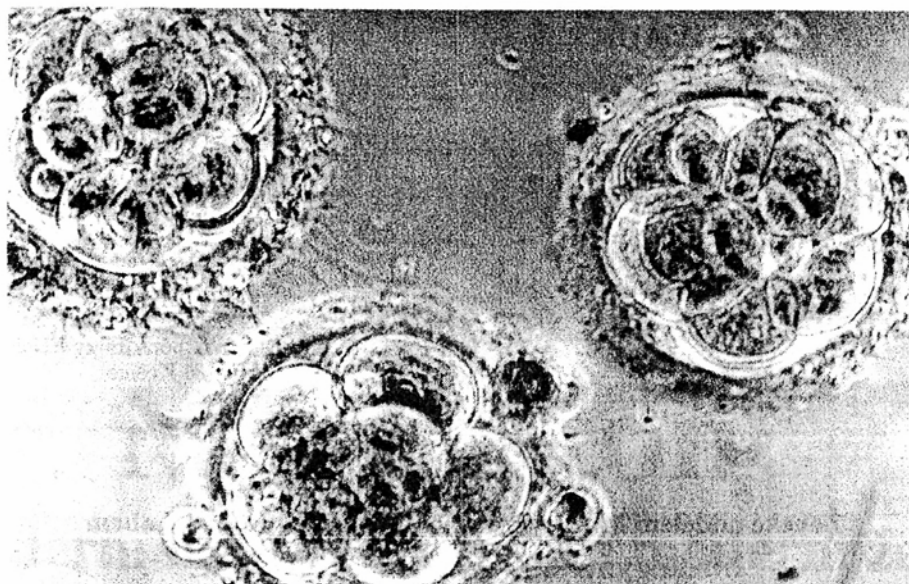
- Fertil. Sex.*, 23, 1995, Suppl. 9, S142 (Abstracts 15th World Congress on Fertility and Sterility, Montpellier, France, September 17 - 22, 1995). 16. **Ventruba, P. a spol.:** Mikromanipulace v oblasti zona pellucida na I. gynek. - porod. klinice v Brně. In: Zborník abstraktov vedeckej konferencie SGPS a ČGPS Bratislava, 9. - 10. 6. 1994, s. 71. 17. **Wright, G. et al.:** Observations on the morphology of human zygotes, pronuclei and nucleoli and implications for cryopreservation. *Human Reprod.*, 5, 1990, s. 109 - 115. 18. **Zetová, L. a spol.:** Asistovaný hatching - zkušenosti s prvními 137 případy. *Asistovaná reprodukce* 4, 1994, č. 2, s. 11 - 12. 19. **Zetová, L., Mardešič, T.:** Úspěšné těhotenství a porod po asistované fertilizaci v programu IVF a ET v ÚPMD. *Čes. Gynek.*, 60, 1995, s. 204 - 205. 20. **Žáková, J. a spol.:** Výsledky IVF po asistovaném hatchingu. *Asistovaná reprodukce*, 4, 1994, č. 2, s. 9 - 10. 21. **Žáková, J. a spol.:** Assisted Hatching - Results in Women with Repeated Embryotransfer Failure. In: IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Vienna, April 3-7, 1995, Monduzzi Editore, Bologna (Italy), 1995, s. 539 - 541. 22. **Žáková, J. a spol.:** Asistovaný hatching - plnospná mikromanipulační technika pro ženy s opakovaně neúspěšným embryotransferem. *Čes. Gynek.*, 61, 1996, s. 7 - 9. 23. **Žáková, J. a spol.:** Výsledky prodloužené kultivace, asistovaného hatchingu a použití dárcovských spermií na I. gynek. porod. klinice v Brně v roce 1994. *Asistovaná reprodukce*, 5, 1995, č. 1, s. 10 - 12.

*Doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.,  
Obilní trh 11, 656 77 Brno*





Obr. 1: Mechanické provádění asistovaného hatchingu pomocí holdingové a operační mikropipety.  
(Foto: J. Žáková - zvětšení 460x)



Obr. 2: Embrya po asistovaném hatchingu připravená k transferu.  
(Foto: J. Žáková - zvětšení 460x)

### 3. KRYOKONZERVACE GAMET, EMBRYÍ A TKÁNÍ

Kryokonzervace je nezbytnou rutinní součástí programu asistované reprodukce. Využívá se pro uchování a budoucí použití lidských zárodečných buněk, embryí nebo tkání, které jsou uskladněné v kontejnerech s tekutým dusíkem při teplotě -196° C.

Přehled o kryokonzervaci buněk a tkání jsme prezentovali v **Publikaci X** a **Publikaci XI**.

Zavedené techniky kryokonzervace vedly k využití v programu dárcovství gamet a embryí.

Biologické, legislativní a etické aspekty, příjem dárců, podmínky darování a vyšetření jsme zpracovali v **Publikaci XII, XIII a XIV**.

Možnosti kryokonzervace vedly na našem pracovišti rovněž ke vzniku programu ochrany fertility u onkologicky nemocných mužů a žen - **Publikace XV až XX**.

**Proces kryokonzervace** zahrnuje několik na sebe navazujících kroků: počáteční vystavení buněk vlivu kryoprotektiv, vlastní zmrazení, skladování a rozmrazení. Rozmrazení spočívá v naředění a odmytí kryoprotektiv a návratu buněk do fyziologického prostředí. Úspěšný proces zmrazení a rozmrazení musí zaručit zachování integrity buněčné struktury i jejich funkčních parametrů. Proto je pro každý typ buněk je proto používán specifický postup.

Kryokonzervují se spermie, oocyty, embrya ve všech vývojových stádiích, zárodečná tkáň z testes a ovariální tkáň [131] .

**Doba skladování** není pro žádný typ buněk a tkání striktně určena. Teoreticky je neomezená, protože při skladování neprobíhají žádné biologické aktivity. Prakticky není známo, jak dlouho mohou buňky zůstat v těchto podmínkách životaschopné. Literární údaje uvádějí, že prokázaná doba skladování, během níž si reprodukční buňky uchovávají schopnost vývoje, je pro oocyty 4 roky [70], pro embrya až 12 let [76] a pro spermie 28 let [25].

Od počátku zavádění kryokonzervace na našem pracovišti prošly významným vývojem metody mrazení, zmrazovací protokoly, kryokonzervační roztoky i nosiče zmrazeného materiálu.

Od roku 2008 platí **zákon 296/2008 Sb. O zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka** (zákon o lidských tkáních a buňkách) a vyhláška **422/2008** o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání

a buněk určených k použití u člověka, který ukládá před zmrazením biologického materiálu provést vždy **serologické vyšetření** z důvodu zhodnocení rizika křížové kontaminace. Před uložením buněk a tkání do kryobanky je nutno vyšetřit HIV 1 a 2 (anti-HIV-1,2), hepatitidu B (HBsAg, anti HBc), hepatitidu C (anti-HCV-Ab) a syfilis.

Zamrazený materiál je do doby získání negativních výsledků umístěn v karanténě. Po prokázání seronegativity je přemístěn do skladovacího kontejneru. V případě positivity na některou infekci, je materiál skladován odděleně v infekčním kontejneru.

### **Způsoby kryokonzervace**

Aby se zabránilo poškození nebo zničení buněk během kryokonzervace, byly vyvinuty dva základní zmrazovací a rozmrazovací postupy. Postup **pomalého počítačem řízeného mrazení** a postup pro **rychlé mrazení - vitrifikaci**.

Zařízení pro kryokonzervaci na našem pracovišti prošlo vývojem od nejjednodušších ramp, které počítač postupně v závislosti na čase spouštěl k hladině dusíku a ponořoval do něj, až po programovatelná zařízení. Od 90. let 20. století jsme používali přístroj pro **pomalé řízené zmrazování Planer Kryo F10** (Sunbury On Thames, U.K.) (obr. 21), který sestává z řídicí počítačové jednotky, zmrazovacího prostoru, sondy a zásobníku tekutého dusíku. Vzorky mohou být umístěny do držáčků na kryptuby nebo na slámky (straws). Programy pro zmrazování různých typů buněk je možno zadat do řídicí jednotky, uložit a poté již na displeji zvolit patřičný program podle mrazeného materiálu. Naprogramovat lze až 10 zmrazovacích programů. Seeding (indukce tvorby ledových krystalů) lze provádět automaticky nebo manuálně. Vlastní mrazení trvá 2,5 – 3 hodiny.

V technice kryokonzervace se kolem roku 2006 udál velký návrat ve zlepšené a ve velkém měřítku aplikované **vitrifikaci**, způsobu zavedeném téměř před 30 lety, ale téměř dvě dekády embryology opomíjeném. Došlo k renesanci metody, která byla používána ještě před zavedením pomalého způsobu mrazení a to zvláště ve veterinární oblasti. Vitrifikace si našla v moderní době své místo hlavně proto, že je to metoda časově méně náročná, trvající pouze 15 – 20 minut a není k ní potřeba žádný přístroj. Provádí se pomocí nádoby s tekutým dusíkem (obr. 22). Buňky se na nosiči zmrazí ponořením do sterilního dusíku a poté se nosič se zmrazeným materiálem umístí do vnějšího označeného obalu. Tento způsob se nazývá otevřený systém.



Dochází-li k vitrifikaci bez přímého kontaktu buněk s dusíkem, kdy jsou buňky na nosiči nejprve umístěny do označeného obalu, uzavřeny a teprve poté zmrazeny, hovoříme o uzavřeném systému. Vitřifikace vyžaduje větší zručnost a zkušenost pracovníka laboratoře, než pomalé mrazení.

### **Kryokonzervační média a nosiče**

Pro úspěšné použití obou metod je nezbytné vystavit buňky nebo tkáň působení ochranných látek - kryoprotektiv.

Při **pomalém mrazení** se používají kryoprotektiva v nízké koncentraci (10 – 15 %), buňky se dehydratují v průběhu mrazení, teplota se snižuje pomalu a tvorba ledových krystalů je řízená. Při **vitřifikaci** se používá vysoká koncentrace kryoprotektiv (40 – 60 %), buňky se dehydratují před mrazením a rychlost snižování teploty je více než 1000°C/min. Při vitřifikaci dochází k solidifikaci roztoku při nízké teplotě bez tvorby krystalů.

Kryoprotektiva mohou být penetrující nebo nepenetrující. Mezi nejčastěji používaná penetrující kryoprotektiva patří glycerol, dimethylsulfoxid, etylenglykol a 1,2-propandiol. Kryoprotektiva nepenetrující – cukry, mají osmoticky dehydratační účinek. Patří mezi ně sacharóza, manitol, sorbitol a trehalóza. Chrání při mrazení proteiny a buněčnou membránu.

Je třeba přesně dodržovat výrobcem předepsané postupy a časy jak při přípravě buněk a tkání na zmrazení, tak při rozmrazování.



Obr. 21: Kryokonzervační zařízení Planer Kryo 10



Obr. 22: Nádoba s tekutým dusíkem pro vitřifikaci

Pro kryokonzervovaný materiál byla vyvinuta řada obalů a nosičů, jako kryptuby pro sperma a testikulární nebo ovariální tkáň, nebo nejrůznější slámky (straws) pro oocyty a embrya. Vitřifikace se nejprve prováděla bez nosiče pouze v podobě kapek, nebo byly používány mřížky

do elektrického mikroskopu. Postupně byly pro vitifikaci oocytů a embryí vyvíjeny nosiče různých tvarů, např. smyček, plátků (McGill cryoleaf, Origio), nebo dírky na tyčince s plochým koncem, které se uzavírají do pejet (Rapid-i Kit, Vitrolife) – viz. obr. 23.



Obr. 23: Pejety pro vitifikaci

### 3.1. Kryokonzervace spermatu a testikulární tkáň

Historie mrazení spermatu začala po druhé světové válce, když se zjistilo, že se azoospermie a těžká oligospermie nedaří vyléčit. Tehdy vznikla myšlenka skladování zamrazeného spermatu a vzniku spermabank. Technika kryokonzervace spermatu je v dnešní době dobře propracovaná a zachovává fertilizační potenciál spermií v průběhu dlouhodobého skladování v tekutém dusíku. Bezpečnost použití zmrazeného spermatu byla prokázána experimentálně i ve veterinární praxi a později narozením množství zdravých dětí po inseminaci spermatem dárce.

Mrazí se buď kompletní sperma nebo zpracované proprané spermie. Některé práce uvádějí, že neproprané spermie jsou lépe chráněny před poškozením v průběhu mrazení/rozmrazení a vykazují lepší pohyblivost a DNA integritu po rozmrazení [20]. Sperma je možno mrazit jak pomalým způsobem pomocí Planer Kryo 10, tak vitifikací [114]. Obě metody dávají dobré výsledky po rozmrazení.

Testikulární tkáň je možno mrazit pomalou metodu, nebo vitifikací. Avšak vhodnější a praktičtější je testikulární tkáň nejprve zpracovat a zamrazit pouze získané spermie.

#### **Materiál a metodika:**

Na našem pracovišti jsme zavedli mrazení spermatu v roce 1991. Kryokonzervace spermatu s Richardsonovým kryoprotektivním médiem byla prováděna na přístroji Planer Kryo 10. Médium jsme si připravovali sami na bázi pufru, glukózy, fruktózy a citrátu sodného. Glycerin

a vaječný žloutek sloužil jako zdroj proteinů a jako kryoprotektivum byl použitý glycerol. Od roku 2000 používáme kryokonzervační média firmy Medi-Cult resp. Origio a od roku 2001 sperma pomocí těchto médií (Cryosperm) vitrifikujeme.

Sperma je po zhodnocení spermiogramu smícháno s kryoprotektivem a je rozplněno do kryotub Nunc o objemu 1,0 nebo 1,8 ml. Zmrazeno a uchováváno je v kontejnerech s tekutým dusíkem (obr. 24).

Rozmrazení spermatu se provádí ponecháním kryotuby při pokojové teplotě až do úplného roztátí vzorku. Poté je kryoprotektivum odmyto centrifugací s promývacím médiem.



Obr. 24: Kryotuby se zamrazeným spermatem

### **3.1.1. Kryokonzervace spermatu u partnerů IVF pacientek a zdravých mužů**

Partneři pacientek IVF programu využívají kryokonzervaci spermatu v těchto případech:

- jako pojistku pro případ selhání vybavení spermatu v den odběru oocytů
- pro případ vlastní nedosažitelnosti v den odběru vajíček z různých důvodů (pracovní, zdravotní, psychické atd.).
- v programu dárcovství oocytů - dárcovská vajíčka mohou být oplozena v den jejich získání bez nutnosti okamžitého příjezdu partnera k odběru spermatu
- uchování spermií získaných při MESA nebo TESE pro budoucí použití bez nutnosti opakovaného chirurgického vstupu.

U zdravých mužů stoupá v posledních letech zájem o uchování spermatu do rezervy. Jsou to nejčastěji aktivní sportovci, muži rizikových profesí, nebo muži odcházející do zahraničních misí.



Na našem pracovišti si **za období 1991 až 2013** nechalo celkem **782 mužů** zamrazit sperma pro použití v léčebných cyklech IVF. Z toho 540 mužů k oplozování oocytů partnerky a 242 mužů pro oplozování darovaných oocytů. Pro vlastní použití v budoucnu si nechalo zamrazit sperma 51 mladých zdravých mužů. Testikulární tkáň byla mrazena ve 3 případech.

V době technik asistované reprodukce, kdy kvalita spermatu není již limitující faktor pro použití po rozmrazení, má technika kryokonzervace spermatu široké využití. Aktivní přístup zdravých mužů k uchování vlastního kvalitního spermatu s ohledem na jeho budoucí využití je díky médiím a šíření osvěty v současné době trendem.

### **3.1.2. Kryokonzervace spermatu dárců a spermabanka**

Program dárcovství spermií a budování **vlastní spermabanky** jsme na našem pracovišti započali v roce 1995. Od té doby jsme se stali největší spermabankou ve státním zdravotnickém zařízení [128].

Sperma dárců se z důvodu nebezpečí přenosu infekčních nemocí nepoužívá čerstvé, ale je nutno jej neprve zamrazit. Po zopakování serlogických testů za 180 dní karantény, může být sperma použito pro účel darování.

Je všeobecně známo, že kryokonzervace způsobuje snížení počtu spermií s normální morfologií. Dochází k poškození integrity membrán, mitochondriální aktivity, akrozomu a bičíku. Zvláště je ovlivněna pohyblivost spermi, která může být po zmrazení/rozmrazení redukována o 20-50 % [13]. Z toho důvodu jsou požadavky kvalitu dárcovského spermatu vyšší (tab. 4), než je norma WHO pro normospermii (tab.7).

Desetiletý přehled o dárcovském programu spermií (1995 – 2005) byl zpracován v **Publikaci XIII.**

#### **Materiál a metodika:**

Požadavky na dárce jsou:

- věk 18 až 35 let
- minimálně středoškolské vzdělání s maturitou
- dobrý zdravotní stav s nezatíženou rodinnou anamnézou
- negativní genetické vyšetření - karyotyp, cystická fibróza
- negativní mikrobiologické vyšetření - aerobní a anaerobní mikroorganismy, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma homini, Chlamydia trachomatis

- negativní serologické vyšetření – HIV 1 a 2 (anti-HIV-1,2), hepatitidu B (HBsAg, anti HBc), hepatitidu C (anti-HCV-Ab) a syfilis, včetně krevní skupiny a Rh faktoru.
- minimální požadované parametry spermatu (tab. 4).
- dotazník zaměřený na fenotypickou charakteristiku, povahu a záliby
- podepsaný informovaný souhlas
- seznámení s anonymitou dárcovství v ČR

Limity pro darování jsme si na pracovišti interně stanovili:

- změna zdravotního stavu
- překročení věkové hranice
- více než 30 zamrazených vzorků
- více než 8 - 10 narozených dětí

**Tab. 4: Minimální požadavky na parametry spermatu dárce na CAR GPK LFMU a FN Brno**

Objem	$\geq 2$ ml
Motilita	$\geq 60$ %
Koncentrace	$\geq 50$ mil/ml
Morfologie	$\geq 30$ % s normální morfologií
Přežívání za 24 hod.	$\geq 50$ % počáteční motility

#### **Výsledky:**

1. Za 18 roků naší spermabanky projevilo zájem stát se dárce 362 kandidátů.
2. Dárce se po projití všemi testy stalo 99 mužů (27,3 % ze zájemců).
3. Nejvíce kandidátů bylo vyřazeno z důvodu nesplnění podmínek na spermioqram (65,7 %).
4. Naše spermabanka nabízí dárce všech krevních skupin a různých fenotypů.
5. Příjemci darovaných spermií si mohou vybírat dárce z naší databáze díky vyplnění dotazníku.
6. Sperma dárců je využíváno pro léčbu metodami IUI, IVF a ICSI.
7. Již 12 dárců bylo vyřazeno z databáze nabízených z důvodu více než 8 narozených dětí.

### **Závěr:**

Vybudování spermabanky a použití spermatu dárců zaujímá v asistované reprodukci stále své důležité místo, přestože máme k dispozici techniky, které dokáží řešit i těžký andrologický faktor. Díky zachování anonymity dárců a příjemců trvá zájem o darování spermatu i o využití dárcovského spermatu. Naši spermabanku využívají nejen klienti našeho centra, ale o kvalitní sperma našich dárců projevilo zájem dalších 5 pracovišť z ČR.

### **3.1.3. Kryokonzervace spermatu u onkologických pacientů**

Poškození reprodukčních funkcí včetně tvorby spermií a následné neplodnosti je dobře známý negativní vedlejší efekt spojený s terapií malignit. Zvyšující se úspěšnost onkologické léčby a aktivní život mladých mužů po jejím zvládnutí vedla na našem pracovišti v roce 1995 k zavedení kryokonzervace před zahájením onkologické (chirurgické, chemické nebo radiologické) léčby pro pozdější použití. Jsme jediné centrum, které se zabývá touto problematikou v tak velkém rozsahu a objemu.

Přehled o nárůstu onkologických pacientů se zájmem o kryokonzervaci spermatu i o výsledcích u pacientů, kteří se po úspěšně prodělané léčbě vrátili na naše pracoviště k léčbě neplodnosti, byl průběžně publikován v našich pracech **Publikace XVIII a XIX**.

**Publikace XX** rozebírá 17ti letou zkušenost s kryokonzervací spermatu a jeho dalším využitím v léčbě infertility u pacientů s testikulárním karcinomem.

### **Materiál a metodika:**

Muži s onkologickým onemocněním (ve věku 13 až 64 let) jsou odesíláni na naše Centrum z Fakultní nemocnice Brno, Masarykova onkologického ústavu v Brně a z Fakultní nemocnice U sv. Anny v Brně. Přehled onkologických diagnóz a počty pacientů uvádí tabulka 6.

Kryokonzervace spermatu byla prováděna do roku 2000 s Richardsonovým médiem jako kryoprotektivem a mrazením pomalým způsobem na přístroji Planer Kryo 10. Od konce roku 2000 je používáno médium firmy Medi-Cult resp. Origio (Dánsko) a k mrazení je volena metoda vitrifikace [135].

Z odběru jednoho pacienta jsou zamrazeny v průměru 4 kryotuby.

Vzorky byly v letech 1995 – 2010 skladovány v Tkáňové bance FN Brno a od roku 2011 jsou uskladněny na Transfúzním a tkáňovém oddělení FN Brno.



Při léčbě neplodnosti je sperma rozmrazeno, zpracováno a používáno pro metody intrauterinní inseminace nebo IVF. V případě oplazování oocytů je standardně prováděna technikou ICSI.

### Výsledky:

1. Za období 1995 až 2013 využilo kryokonzervaci spermatu 1111 onkologických pacientů (1195 odběrů). Se stoupající informovaností onkologických pracovišť počet pacientů narůstal (tab. 5).
2. Nejčastějšími diagnózami byl tumor varlete (47,4 %), lymfom Hodgkin (17,8 %) a leukémie (10,6 %) - tab. 6.
3. Za období 18 let bylo zamrazeno 5335 kryptub spermatu.
4. K léčbě neplodnosti se na naše pracoviště ze skupiny pacientů s tumorem varlete vrátilo 34 mužů (6,5 %). Jejich partnerky podstoupily 57 léčebných cyklů.
5. Interval mezi onkologickou léčbou a léčbou neplodnosti byl 7 až 70 měsíců.

**Tab. 5: Počty mužů (onkologických pacientů) s kryokonzervovaným spermatem na GPK LF MU a FN Brno v letech 1995 – 2012**

Rok	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Počet mužů	2	10	27	20	38	50	55	61	62

Rok	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Počet mužů	62	87	88	68	81	95	74	69	62

### Závěr:

Kryokonzervace spermatu před onkologickou léčbou je předpokladem úspěchu léčby následné neplodnosti. Kryokonzervace by měla být nabídnuta každému pacientovi před terapií vedoucí k destrukci spermatogeneze. Zamražené sperma je pozitivní faktor pro emocionální boj s nemocí, i kdyby nebylo nikdy použito. Program vyžaduje těsnou **spolupráci centra asistované reprodukce s onkologickými pracovišti** i se zázemím, kde je možno takové množství materiálu skladovat.

**Tab. 6: Přehled onkologických diagnóz a počtu pacientů s kryokonzervovaným spermatem v letech 1995 – 2013 na GPK LF MU a FN Brno**

Onkologická diagnóza	Počet pacientů	%
Tumor varlete	523	47,4
Lymfom Hodgkin	199	17,8
Leukémie	119	10,6
Lymfom non-Hodgkin	72	6,5
Osteosarkom	68	6,1
Tumor zažívacího traktu	32	2,8
Tumor CNS	15	1,4
Tumor močového traktu	11	1,0
Tumor respiračního traktu	11	1,0
Ostatní	61	5,4
Celkem	1111	100

### 3.2. Kryokonzervace embryí

Mrazení lidských embryí se vyvinulo z aplikace kryokonzervačních technik pužitých u zvířat. V roce 1972 Whittingham [116] dosáhl narození myši z transferu moruly zamražené pomalým zmrazovacím protokolem s dimethylsulfoxidem (DMSO). Stejný protokol vedl k prvnímu těhotenství u člověka ze zamraženého 8 buněčného embrya v Austrálii [100]. Následován byl porodem dvojčat v Holandsku v roce 1984 [118].

Při asistované reprodukci vzniká superovulací více oocytů a následně embryí, než je vhodné použít k transferu. Kryokonzervace embryí byla původně vyvinuta aby zachránila nadpočetná embrya pro budoucí použití.

Důležité místo zaujímá program dárcovství, kdy jsou zamrazená embrya připravena pro použití u příjemkyň darovaných oocytů nebo darovaných embryí. Příjemkyně darovaných oocytů mají embrya vzniklá oplozením spermatem jejich partnera. Příjemkyně darovaných embryí mají embrya vzniklá jak z darovaných oocytů, tak z darovaných spermií [129, 131].

V programu zachování fertility je kryokonzervace embryí jednou z možností pro pacientky před onkologickou léčbou [133].

Indikace k mrazení embryí:

- nadpočetná embrya
- středně závažný až závažný ovariální hyperstimulační syndrom, žena by byla při přenosu embryí vystavena riziku ohrožení zdraví
- překážka provedení transferu čerstvých embryí (akutní nemoc, děložní polyp, nízká sliznice, předčasná luteinizace, krvácení)
- technický problém při provedení transferu
- program dárcovství vajíček a embryí
- uchování embryí žen před radio- nebo chemoterapií

### **Materiál a metodika:**

Embrya jsou úspěšně mrazena za použití propanediolu (PROH), DMSO nebo glycerolu. Každé kryoprotektivum je vhodné pro určité stádium – PROH nebo DMSO je lepší pro zygoty nebo dělící se embrya, zatímco glycerol je vhodnější pro blastocysty. Embrya určená ke kryokonzervaci by neměla obsahovat více než 30 % fragmentů.

Pro mrazení embryí lze využít pomalý způsob mrazení nebo vitrifikaci.

Při pomalém mrazení Planerem Kryo 10 je teplota z počáteční pokojové teploty snižována rychlostí  $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $-7^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě ponechat 5 minut před provedením seedingu a poté z  $-7^{\circ}\text{C}$  snižovat rychlostí  $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $-30^{\circ}\text{C}$ . Z  $-30^{\circ}\text{C}$  snižovat rychlostí  $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $-150^{\circ}\text{C}$ . Poté přenést pejety do kontejneru s kapalným dusíkem k uskladnění při  $-196^{\circ}\text{C}$  (obr. 26).

Vitrifikace zygot a rýhujících se embryí je rovnocennou metodou a provádí se ve 2 nebo 3 krocích postupným překládáním embryí do médií pro vitrifikaci (obr. 25).

Rozmrazení probíhá dle protokolu adekvátního ke zmrazování. Je třeba dodržovat přesný postup uvedený výrobcem.

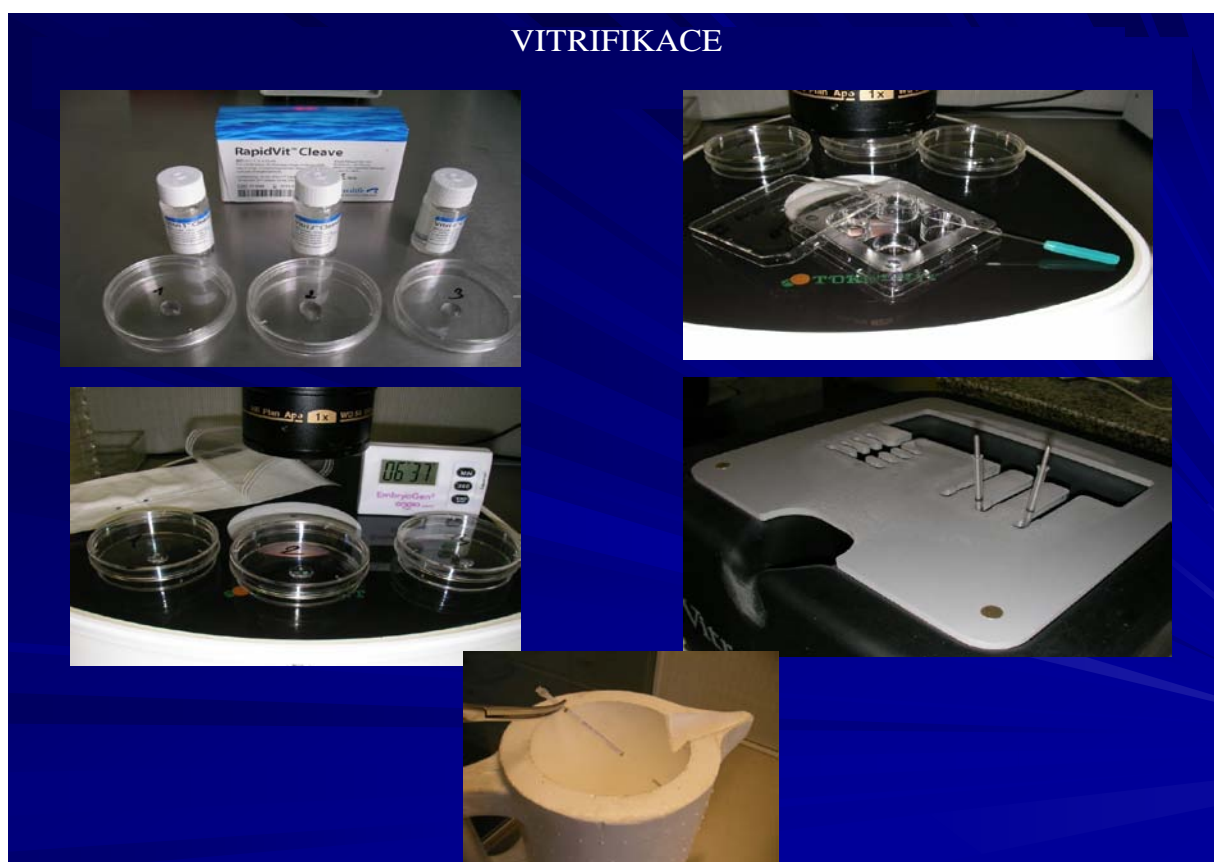
Faktory, které ovlivňují efektivitu transferu rozmrazených embryí byly popsány v **Publikaci XI**.

### **Výsledky:**

1. Na našem pracovišti jsme zahájili **program kryokonzervace embryí** pomalým způsobem na zařízení Planer v **roce 1992**.
2. V roce 1994 jsme dosáhli prvního těhotenství z embryí po rozmrazení.



3. **První dítě** po transferu rozmrazených embryí po IVF (KET-IVF) se narodilo **v roce 1996**.
4. Od roku 1997 jsme na základě fungující kryokonzervace zavedli program dárcovství.
5. Od roku 2007 embrya mrazíme rychlejší metodou vitrifikace.
6. Za období **1992 až 2013 jsme zamrazili 6105 embryí**.
7. Provedli jsme 2310 kryoembryotransferů (KET).
8. Úspěšnost po KET se na našem pracovišti je **26,2 % PR**.



Obr. 25: Pomůcky pro provádění vitrifikace: misky s kryoprotektivními médii, pejety na embrya (straws) jsou umístěné v nádobách v tekutém dusíku

#### **Závěr:**

Úspěšnost kryokonzervace embryí a výsledku po embryotransferu je závislá na množství faktorů: na kvalitě časného embrya, na věku ženy, příčině infertility, způsobu mražení, na výsledku předchozího čerstvého transferu, na morfoloické kvalitě rozmrazeného embrya

a dalších [125]. Embryotransfer lze provést ve stejný den jako rozmrazení nebo další den po několikahodinové kultivaci.

Kryokonzervace embryí slouží v programu dárcovství oocytů nebo embryí. Pro ženy před onkologickou léčbou může kryokonzervace vlastních embryí sloužit jako „ochrana fertility“ pro budoucí použití.



Obr. 26: Skladovací kontejnery s tekutým dusíkem

### 3.3. Kryokonzervace oocytů

Po řadu let od prvně publikované práce [39] nebyla kryokonzervace oocytů příliš používanou metodou kvůli nízkému procentu přežívání oocytů, fertilizace, vyvíjejících se embryí a jejich špatné kvalitě. Technika vyšla z kryokonzervačních protokolů užívaných pro embrya. Četné práce vedené snahou o zkvalitnění výsledků se zabývaly modifikací těchto laboratorních postupů, jako např. zvýšení koncentrace sacharózy, změny počáteční teploty kryoprotektiva, změny teploty pro seeding, užití média s nízkým obsahem sodíku nebo např. injekce kryoprotektiva do oocytu.

Důležitý je způsob oplozování oocytů po rozmrazení. Změny v zona pelucida, poškození funkce kortikálních granul a částečná disrupce membrán, která způsobila blok splynutí a penetrace spermií vedly k nízkému procentu oplození. Tyto překážky se podařilo úspěšně obejít použitím ICSI [74].

Indikace k mrazení oocytů:

- možnost uchování oocytů pacientek s rizikem předčasného ovariálního selhání
- skladování zmrazených darovaných oocytů v programu dárcovství odbourává nutnost synchronizace cyklů dárkyně a příjemkyně
- řešení v případě neočekávané absence partnerových spermií v den odběru oocytů (překážka zdravotní, dopravní, pracovní nebo i momentální psychické rozpoložení)
- pomoc pro ženy s onkologickým onemocněním u kterých nemohou být zamrzena embrya, např. nemají vhodného partnera a odmítají dárcovské sperma
- možnosti zamrazení a skladování oocytů se nově jeví jako příležitost pro ženy, které neplánují bezprostředně těhotenství a chtěly by si uschovat „mladé oocyty“ pro vlastní použití v budoucnu

### **Materiál a metodika:**

Oocyty se mrazí nejdříve 5 hodin po odběru, po odstranění buněk cumulus oophorus [40].

Roztoky pro mrazení a rozmrazení obsahují jako kryoprotektivum nejčastěji 1,2 propandiol (PROH) a sacharózu. Může být použit i DMSO.

Po projití řadou příslušných ekvilibračních a kryokonzervačních roztoků se mohou mrazit jak pomalým způsobem, tak vitrifikací.

Pro rozmrazení se volí protokol odpovídající způsobu zamrazení (pomalé, rychlé). Rozmrazené oocyty se po projití řadou roztoků, kdy se odmyvá kryoprotektivum a optimalizují osmotické podmínky, umístí do kultivačního média.

Vloží se do CO<sub>2</sub> inkubátoru s teplotou 37° C se ponechají 2 až 4 hodiny regenerovat než se přistoupí k oplozování.

### **Výsledky:**

1. Oocyty jsme na našem pracovišti poprvé mrazili pomalým způsobem na přístroji Planer u dvou pacientek v roce 2003.
2. V roce 2006 jsme stejným způsobem zamrazeny oocyty 3 pacientek. Byly to vyjíměčné případy (nedostavení se partnera k odběru spermií) a mrazení vycházelo z postupu pro mrazení embryí.
3. **Od roku 2010** provádíme **mrazení oocytů** výhradně vitrifikací a doposud jsme zamrazili oocyty 8 dárkyň pro program dárcovství.

4. Jako způsob ochrany fertility si zvolily kryokonzervaci oocytů 3 pacientky před onkologickou léčbou, které nemají v současné době vhodného partnera, aby mohly využít kryokonzervaci embryí.

#### **Závěr:**

Kryokonzervace oocytů je v současné době slibná alternativa zmrazování embryí. Je vhodná pro pacientky s rizikem předčasného ovariálního selhání. Také pro mladé dívky, kterým plánovaná chemoterapie zničí pohlavní buňky, je to možná varianta řešení.

#### **3.4. Kryokonzervace ovariální tkáně jako ochrana fertility**

Chemoterapie jako jedna ze základních modalit onkologické léčby zanechává často trvalé následky. Mezi nejčastější patří neplodnost na základě ireverzibilního poškození gonád. Jednou z metod zachování fertility u žen s nádorovým onemocněním je kryokonzervace ovariální tkáně. Metoda kryokonzervace ovariální tkáně byla vyvinuta na našem pracovišti na podkladě dříve publikovaných prací jiných autorů [2, 21, 57]. Některé aspekty popsaných postupu byly modifikovány na základě vlastních zkušeností. První kryokonzervaci jsme provedli v roce 2004. V letech 2004–2007 jsme řešili grant **IGA MZ ČR NR/8469-3 „Možnosti ochrany reprodukčních funkcí u žen podstupujících chemoterapii pro hematologickou malignitu“**. Způsoby odběru materiálu, zpracování tkáně, kryokonzervace, elektronová mikroskopie a zhodnocení kvality zmrazeného/rozmrazeného materiálu, včetně 6ti letých zkušeností s tímto programem jsou podrobně popsány v **Publikacích XVIII, XIX a XX**.

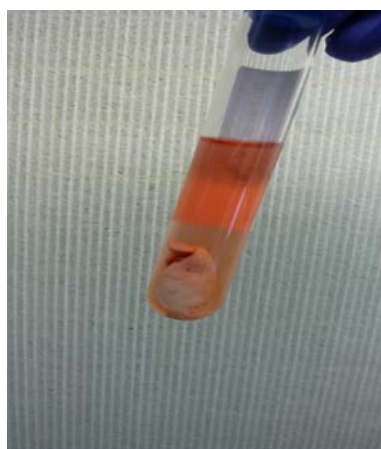
Indikace ke kryokonzervaci ovariální tkáně:

- je vhodná pro mladé dívky, u kterých je zřejmé, že jim plánovaná chemoterapie zničí pohlavní buňky, a které nemají zatím partnera, aby podstoupily stimulaci ovarií, oplození oocytů a zamrazení embryí
- pro ženy, u kterých na hyperstimulaci ovarií již není čas, neboť celá procedura by odsunula onkologickou léčbu nejméně o 14 dní až 3 týdny
- pro ženy, které z důvodu rizika zhoršení nemoci nemohou hyperstimulaci ovarií podstoupit

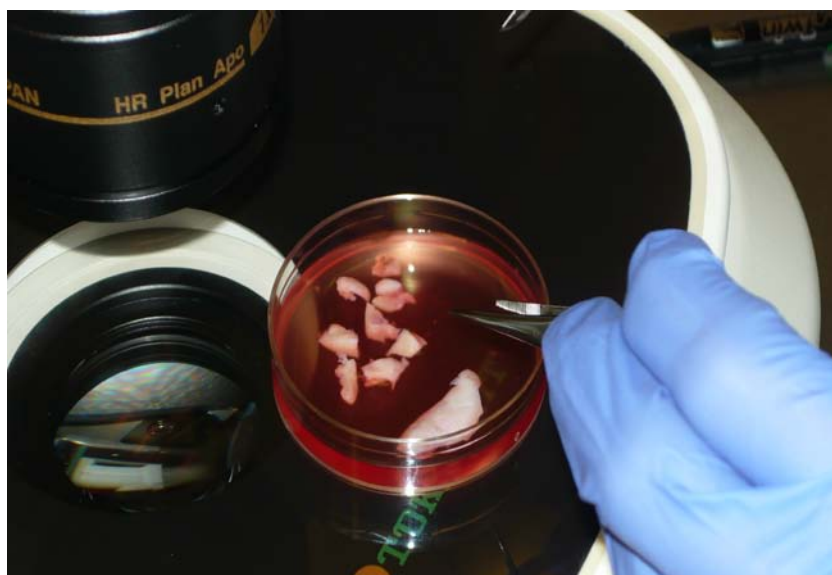


### **Materiál a metodika:**

Odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky za krátkodobé hospitalizace pacientky. Množství ovariální tkáně odebírané pro účely kryokonzervace je vzorek ovariální kúry o rozměrech cca 10 x 20 mm a tloušťce 1-2 mm z obou ovaríí. Tkáň ovariálního kortexu je uložena do kultivačního média a transportována do embryologické laboratoře k dalšímu zpracování (obr. 27). V laboratoři je nařezána skalpelem na menší části o velikosti asi 10 x 3 x 2 mm (obr. 28). Poté je sycena kryoprotektivním médiem. Po inkubaci v kryokonzervačním médiu jsou 4 až 6 kousků vloženo do jedné kryotuby (Nunc) a vitrifikovány.



Obr. 27: Odebraná ovariální tkáň



Obr. 28: Zpracování ovariální tkáně před kryokonzervací

### **Výsledky:**

1. Technika kryokonzervace ovariální tkáně je rozvíjena na našem pracovišti **od začátku roku 2004**, kdy se jednalo o ojedinělé případy.  
V prvních 3 letech jsme používali zejména metodu pomalého mrazení za použití zařízení Planer Kryo F10. Od roku 2007 kryokonzervujeme vitrifikací.
2. Od ledna 2006 do konce roku 2013 byla ovariální tkáň kryokonzervována **celkem u 20 pacientek před plánovanou gonadotoxickou léčbou**. Hodgkinův lymfom (11x), non-hodgkinový lymfom (5x), akutní myeloidní leukémie (1x), karcinom ovaria (1x), karcinom jazyka (1x), systémový lupus erythematoses (1x).
3. Pomalou metodou mrazení byly zpracovány vzorky od 8 pacientek a metodou vitrifikace od 12 pacientek.
4. Průměrný věk pacientek byl 26,7 roků. Nejmladší pacientka měla 13 let.
5. Průměrný čas do zahájení chemoterapie nepřesahoval jeden týden.
6. Ve dvou případech byl pro velmi vysoké riziko trvalého ovariálního selhání odebrán jeden celý vaječník.
7. Pro zjištění vhodnosti našeho postupu při kryokonzervace a kvality tkáně po rozmrazení jsme provedli elektronově mikroskopické vyšetření dvou náhodných vzorků ovariální tkáně.  
Byly zjištěny jak minimální strukturální změny v primordiálních a primárních ovariálních folikulech, tak i buňky s částečnou destrukcí [133].
8. S transplantací ovariální tkáně nemáme zatím na našem pracovišti zkušenost.

### **Závěr:**

Kvalitní kryokonzervace otevřela zcela nové možnosti pro ochranu fertility žen před onkologickou léčbou. Kromě mrazení oocytů a embryí může být uchována stejným způsobem ovariální tkáň. Slouží převážně pro ženy bez partnera a velmi mladé ženy.

Možnost kryokonzervace buněk nebo tkání může významně zlepšit kvalitu života mladé pacientky. V současnosti existuje již více než deset let klinických zkušeností s technikami kryokonzervace ovariální tkáně u člověka. Narození již desítek zdravých dětí s použitím této techniky dává šanci pacientkám do budoucna, ale zatím je stále nutné považovat tuto techniku za experimentální.

# **PUBLIKACE X**

# Kryokonzervace buněk a tkání v asistované reprodukci

J. Žáková, P. Ventruba, E. Lousová, I. Crha, R. Hudeček

Gynekologicko-porodnická klinika, LF MU a FN Brno

**Souhrn:** Práce podává přehled o vývoji a možnostech kryokonzervace zárodečných buněk, embryí a tkání v asistované reprodukci. Uvádí indikace k mrazení a skladování spermií, oocytů, embryí, testikulární a ovariální tkáně. Popisuje dva zmrazovací a rozmrazovací postupy (pomalé počítačem řízené mrazení, vitrifikace) včetně použití kryoprotektiv (glycerol, DMSO, PROH). Před skladováním je nutné provést sérologické vyšetření na HIV1, 2, hepatitis a syfilis, aby se zabránilo křížové kontaminaci biologického materiálu v prostředí skladovacího kontejneru.

**Klíčová slova:** kryokonzervace - vitrifikace - kryoprotektivum - rozmrazení - spermie - oocyt - embryo - ovariální tkáň

## Cryopreservation of cells and tissues in assisted reproduction

**Summary:** The paper reviews a past development and current options available for cryopreservation of germinal cells, embryos and tissues in assisted reproduction. Indications for cryopreservation and storage of sperm, oocytes, embryos and testicular and ovarian tissue are presented. Two cooling and thawing methods are described (slow computer-assisted freezing, vitrification), including the use of cryoprotectants (glycerol, DMSO, PROH). Prior to storage in a cryostorage vessel, serological examination of HIV1,2; hepatitis and syphilis to prevent cross contamination of biological material has to be performed.

**Key words:** cryopreservation - vitrification - cryoprotectant - thawing - sperm - oocyte - embryo - ovarian tissue

## Úvod

Experimenty s dopadem nízkých teplot na živé organismy byly popsány již v 17. století, kdy byla v roce 1665 publikována monografie Roberta Boyla „New Experiments and Observations Touching Cold“. Experimentálními pracemi ve vztahu ke kryobiologii se zabývali v 18. a 19. století Leeuwenhoek v Holandsku, Needham v Anglii, Spallanzini v Itálii a Reamur a Claude-Bernard ve Francii.

Éra moderní kryobiologie začala v roce 1940, kdy Basile J. Luyet zveřejnil práci „Life and Death at Low Temperatures“. Popsal možnost mrazení bez tvorby ledových krystalů, tzv. vitrifikaci, která se používá ke kryokonzervaci i v dnešní době.

Mrazením v oblasti reprodukční biologie se v Anglii začali zabývat A. Polge, Ch. Smith a A. Parkes, kteří se pokoušeli zmrazit spermie kohouta.

Při svých experimentech objevili v roce 1949 protektivní účinek glycerolu. Testovali pohyblivost spermií po rozmrazení a různě modifikovali kryoprezervační média, která se skládala ze solného roztoku syčeného mléčným práškem, vaječným žloutkem, cukrem a glycerolem [1,2]. Postupně vedlo použití glycerolu i k mrazení lidských spermií a dodnes zůstává běžně používaným médiem při mrazení spermatu.

Historie mrazení humánního spermatu začala po druhé světové válce. Myšlenka založení spermabank a skladování zmrazeného spermatu vznikla, když se zjistilo, že se azoospermie a těžká oligospermie nedaří vyléčit. Technika kryokonzervace spermatu je v dnešní době dobře propracována a zachovává fertilizační potenciál spermií v průběhu dlouhodobého skladování v tekutém dusíku. Bezpečnost použití zmrazeného spermatu byla pro-

kázána experimentálně nejprve ve veterinární praxi a později narozením řady zdravých dětí po inseminaci spermatem dárce.

Mrazení lidských embryí se vyvinulo rovněž z aplikace kryokonzervačních technik používaných dříve u zvířat. V roce 1972 dosáhl Whittingham úspěchu v podobě narození myši z transferu moruly zamrazené pomalým zmrazovacím protokolem s DMSO [3]. Stejný protokol vedl k prvnímu těhotenství u člověka za použití zamrazeného osmibuněčného embrya v Austrálii v roce 1983 [4]. Následoval porod dvojčat v Nizozemsku v roce 1984 [5].

V dnešní době je kryokonzervace technikou, která se provádí na všech pracovištích asistované reprodukce. Aplikuje se pro uchování a budoucí použití lidských zárodečných buněk a tkání, které jsou uskladněny v kontej-



nerech s tekutým dusíkem při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kryokonzervují se spermie, oocyty (nezralé oocyty, oocyty v metafázi II), embrya ve všech vývojových stádiích (zygoty, několikabuněčná embrya, moruly a blastocysty), zpracovaná tkáň varlat a ovariální tkáň.

Celý proces zahrnuje několik na sebe navazujících kroků: počáteční vystavení buněk vlivu kryoprotektiv, zmrazení pod bod mrazu, skladování, rozmrazení, naředění a odmytí kryoprotektiv a návrat buněk do fyziologického prostředí, které umožní jejich další vývoj.

### Zmrazování

Aby se zabránilo poškození nebo zničení buněk během kryokonzervace, byly vyvinuty dva základní zmrazovací a rozmrazovací postupy: postup pomalého počítačem řízeného mrazení a postup pro rychlé mrazení, vitrifikaci.

Nejčastěji používaným zařízením pro pomalé řízené zmrazování je Planer Kryo F10 (obr. 1), který sestává z řídicí počítačové jednotky, zmrazovacího prostoru, sondy a zásobníku tekutého dusíku. Proces mrazení trvá 2,5–3 hod.

Vitrifikace je rychlejší, trvá pouze několika minut, a provádí se bez použití přístroje. Ke zmrazení slouží nádoba s tekutým dusíkem. Buňky jsou na nosiči zmrazeny ponořením do sterilního dusíku, poté je nosič se zmrazeným materiálem umístěn do vnějšího označeného obalu. Tento způsob se nazývá „otevřený systém“. Dochází-li k vitrifikaci bez přímého kontaktu buněk s dusíkem, kdy jsou buňky na nosiči nejprve umístěny do označeného obalu, uzavřeny a teprve poté zmrazeny, hovoříme o „uzavřeném systému“. Vitrifikace vyžaduje větší zručnost a zkušenost pracovníka laboratoře než pomalé mrazení.

Pro úspěšné použití obou metod je nezbytné vystavit buňky nebo tkáň působení ochranných látek – kryoprotektiv. Mezi nejčastěji používaná nepenetrující kryoprotektiva patří glycerol,



Obr. 1. PlanerKryo F10.

DMSO (dimethylsulfoxid), EG (etylen glykol) a PROH (1,2-propandiol). Kryoprotektiva nepenetrující – cukry, mají osmoticky dehydratační účinek. Patří mezi ně sacharóza, manitol, sorbitol a trehalóza. Při mrazení chrání proteiny a buněčnou membránu.

Při pomalém mrazení se používají kryoprotektiva v nízké koncentraci (10–15 %), buňky se dehydratují v průběhu mrazení, teplota se snižuje pomalu a tvorba ledových krystalů je řízena. Při vitrifikaci se používá vysoká koncentrace kryoprotektiv (40–60 %), buňky se dehydratují před mrazením a rychlost snižování teploty je více než  $1\ 000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Při vitrifikaci dochází k solidifikaci roztoku při nízké teplotě bez tvorby krystalů.

Média pro přípravu gamet, embryí a tkání před mrazením a na proces jejich rozmrazování jsou v různých modifikacích vyráběna řadou firem (Vitrolife, Origio, COOK, SAGE). Firmy si přesné složení chrání a jednotlivé roztoky v setu nazývají jako ekvilibrační, omývací, zmrazovací, vitrifikační apod. [6,7]. Úspěšný proces zmrazení a rozmrazení musí zaručit zachování integrity buněčné struktury i jejich funkčních parametrů. Pro každý typ

buněk je proto používán specifický zmrazovací a rozmrazovací postup.

### Kryokonzervace spermií

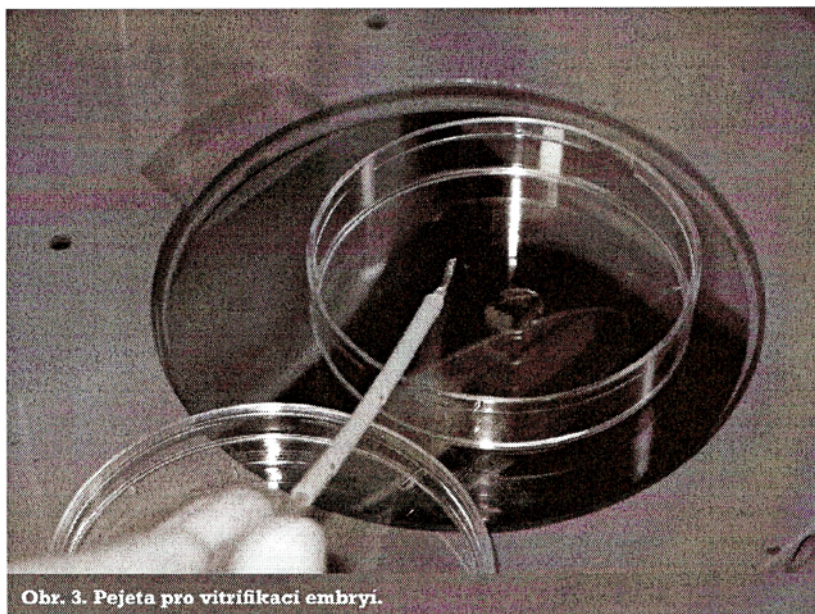
V době mikromanipulačních technik, kdy kvalita spermatu již není limitujícím faktorem pro kryokonzervaci, má tato technika široké využití a mohou se mrazit i jednotlivé spermie.

1. Kryokonzervace spermatu dárců je nejstarší důvod mrazení spermatu [8]. Mrazení nabylo na důležitosti se vznikem nebezpečí přenosu AIDS. Čerstvé sperma nemůže být použito dříve než po zopakování sérologických testů za 180 dní od zamrazení a potvrzení jejich negativity.
2. Dalším častým důvodem je pojistka pro případ selhání v den odběru vajíček nebo pro případy, kdy se partneri pacientek programu asistované reprodukce nemohou dostavit v určenou dobu.
3. Uchování spermií získaných při invazivních mikrochirurgických metodách z nadvarlete (MESA) nebo varlete (TESE) má zásadní význam pro další použití spermií bez nutnosti opakovaného chirurgického vstupu.
4. V programu darovaných oocytů zajistí dopředu zmrazené sperma





Obr. 2. Kryotuby se zamrazeným spermatem.



Obr. 3. Pejeta pro vitifikaci embryí.

partnera příjemně možnost oplodnění tehdy, když jsou získány dárčovské oocyty.

5. Poškození reprodukčních funkcí je vedlejší efekt spojený s léčbou malignit. Zvyšující se úspěšnost onkologické léčby (zvláště při Hodgkinově lymfomu a tumoru varlat) vedla k zavedení kryokonzervace sper-

matu před zahájením chirurgické, chemické nebo radiologické léčby a jeho uskladnění pro pozdější použití [9,10]. Významným faktorem při poškození spermie je oxidační stres a nedostatečná funkce systémů, které kyslíkové radikály eliminují. Zajímavé výsledky přináší výzkum homocysteinu a kyseliny lis-

tové v souvislosti se spermatogenezi [11].

6. Kryokonzervaci spermatu také často využívají mladí muži kvůli obavám o kvalitu svého spermatu v době, až budou chtít počít potomstvo. Zájem projevují především mladí muži z řad vojáků, kteří odjíždějí na zahraniční mise.

### Mrazení a rozmrazení spermií

Mrazí se buď ejakulát, nebo již zpracované probrané spermie. Některé práce uvádějí, že neprobrané spermie jsou lépe chráněny před poškozením v průběhu mrazení/rozmrazení a vykazují lepší pohyblivost a DNA integritu po rozmrazení [12]. Může se mrazit i testikulární tkáň získaná při TESE (Testicular Sperm Extraction). Výhodnější je však testikulární tkáň přímo po odběru zpracovat a zamrazit již získané spermie. Význam to má hlavně proto, že je po zpracování známo, zda se nějaké spermie z tkáně získaly, případně v jakém množství a jak kvalitní. Spermie se mrazí a skladují v kryotubách, např. firmy Nunc (obr. 2). Rozmrazení se provádí pozvolným táním při pokojové teplotě. Poté se provede odmytí kryoprotektiva centrifugací s promývacím médiem.

Je známo, že kryokonzervace způsobuje změny v morfologii spermií - dochází ke snížení počtu normálních morfologií. Dále dochází k poškození integrity membrán, mitochondriální aktivity, akrozomu a bičíku. Zvláště ovlivněna je pohyblivost spermií a je všeobecně akceptováno, že po proceduře zmrazení/rozmrazení je redukována o 20-50% [13].

### Kryokonzervace oocytů

Po řadu let od prvně publikované práce [14] nebyla kryokonzervace oocytů příliš používanou metodou, a to kvůli nízkému procentu přežívání oocytů po rozmrazení, procentu oplozených a vyvíjejících se embryí a jejich špatné kvalitě. Technika vyšla z kryokonzervačních protokolů užívaných pro embrya. Bylo nutno provést řadu experimentů zabývajících se nej-



různějšími modifikacemi těchto laboratorních postupů, aby vedly ke spolehlivému použití pro oocyty. Úspěšnost metody zvýšilo zvláště zavedení ICSI, a umožnilo tak zahájení kryokonzervace oocytů v rutinní praxi.

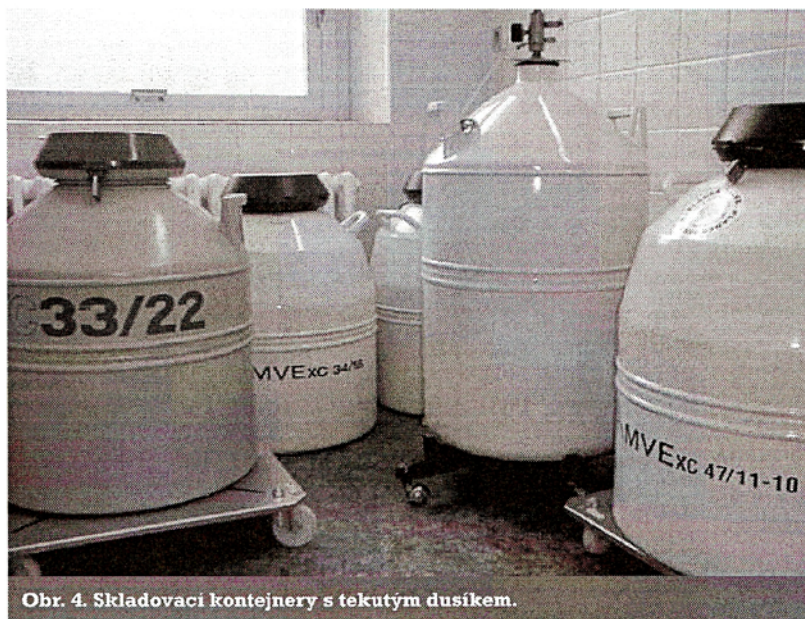
V současné době je kryokonzervace oocytů využívána v následujících případech:

1. Umožní uchování oocytů pro pacientky s rizikem předčasného ovariálního selhání.
2. Skladování zmrazených darovaných oocytů v programu dárcovství odbourává nutnost synchronizace cyklů dárkyně a příjemkyně.
3. Řešení v případě neočekávané absence partnerových spermií v den odběru oocytů (překážka zdravotní, dopravní, pracovní nebo i v podobě momentálního psychického rozpoložení). Dříve by tyto oocyty po 18-20 hod odsouzeny k zániku.
4. Pomáhá ženám s onkologickým onemocněním, u kterých nemohou být zamrzena embrya. Tyto ženy nemají vhodného partnera a odmítají dárcovské sperma.
5. Možnost skladování oocytů se nově jeví jako příležitost pro ženy, které neplánují bezprostředně otěhotnět a chtěly by si uschovat „mladé oocyty“ pro vlastní použití v budoucnu.
6. Kryokonzervace oocytů minimalizuje etické a právní komplikace spojené se skladováním embryí. V některých zemích je mrazení embryí dokonce zakázáno (Německo, Rakousko, Švýcarsko, Dánsko, Švédsko).

### Mrazení a rozmrazení oocytů

Oocyty by měly být mrazeny nejdříve 5 hod po odběru. Roztoky pro mrazení a rozmrazení obsahují jako kryoprotektivum nejčastěji 1,2-propandiol (PROH) a sacharózu. Může být použit i DMSO. Poté, co projdou řadou příslušných ekvilibračních a kryokonzervačních roztoků, se mohou mrazit jak pomalým způsobem, tak vitrifikací.

Pro rozmrazení se volí protokol odpovídající způsobu zamrazení (pomalé, rychlé). Rozmrazené oocyty



Obr. 4. Skladovací kontejnery s tekutým dusíkem.

se po odmýtí v řadě roztoků, kdy se zbavují kryoprotektiva a optimalizují se osmotické podmínky, umístí do kulturačního média. Vloží se do CO<sub>2</sub> inkubátoru s teplotou nastavenou na 37 °C a zde se ponechají 2-4 hod, než se přistoupí k oplozování [15].

### Kryokonzervace embryí

Při asistované reprodukci vzniká stimulací ovarií více oocytů, a následně embryí, než je vhodné použít k transferu. V současné době je z důvodu minimalizace rizika vícečetného těhotenství doporučeno transferovat maximálně dvě embrya.

1. Kryokonzervace embryí byla tedy původně vyvinuta proto, aby zachránila nadpočetná embrya.
2. Využití technologie bylo dále rozšířeno na případy středně závažného až závažného ovariálního hyperstimulačního syndromu, kdy není vhodné provádět embryotransfer.
3. Dalším důvodem kryokonzervace je jakákoliv překážka při provádění transferu čerstvých embryí (akutní nemoc, děložní polyp, nízká sliznice, krvácení, technický problém).
4. Aplikuje se v programu dárcovství embryí.

5. Stále častěji je kryokonzervace využívána pro uchování embryí onkologicky nemocných žen před radio- nebo chemoterapií.

### Mrazení a rozmrazení embryí

Embrya jsou úspěšně mrazena za použití PROH, DMSO nebo glycerolu. Každé kryoprotektivum je vhodné pro jiné vývojové stadium - PROH nebo DMSO je vhodnější pro zygoty a dělicí se embrya, zatímco glycerol je vhodnější pro blastocysty. Embrya se mrazí v pejetách po dvou až třech (obr. 3).

Pro mrazení embryí lze využít vitrifikaci nebo pomalý postup pomocí Planer Kryo 10. Při pomalém mrazení je teplota z počáteční hodnoty odpovídající pokojové teplotě snižována rychlostí -2 °C/min do -7 °C, dále se snižuje rychlostí -0,3 °C/min do -30 °C a rychlostí -50 °C/min do -150 °C, kdy se pejety s embryí vyjmou a přenesou do kontejneru s kapalným dusíkem k uskladnění (obr. 4).

Rozmrazení probíhá dle adekvátního zmrazovacího protokolu. Přesný postup pro každé médium je uveden na příbalovém letáku k zmrazovacím médiím.





Obr. 5. Příprava ovariální tkáně ke kryokonzervaci.

Úspěšnost kryokonzervace embryí a výsledku po embryotransferu závisí na kvalitě časného embrya (neměla by se mrazit embrya s více než 30% fragmentů), na věku ženy, příčině infertilit, způsobu mrazení, na výsledku předchozího čerstvého transferu, na morfologické kvalitě rozmrazeného embrya a dalších faktorech.

### Kryokonzervace ovariální tkáně

Chemoterapie zanechává, jako jedna ze základních modalit onkologické léčby, často trvalé následky. Mezi nejčastější patří neplodnost na základě ireverzibilního poškození gonád. Jednou z metod zachování fertility u žen s nádorovým onemocněním je, vedle možnosti zamrazit oocyty nebo embrya, kryokonzervace ovariální tkáně [16,17].

1. Kryokonzervace ovariální tkáně je vhodná pro mladé dívky, u kterých je zřejmé, že jim plánovaná chemoterapie zničí pohlavní buňky, a které nemají zatím partnera, aby podstoupily stimulaci ovarii, oplození oocytů a zamrazení embryí.
2. Dále se hodí pro ženy, u kterých na hyperstimulaci ovarii již není

čas, neboť by celá procedura odsunula léčbu nejméně o 14 dní až 3 týdny.

3. Je přijatelná i pro ženy, které z důvodu rizika zhoršení nemoci nemohou hyperstimulaci ovarii podstoupit vůbec.

### Odběr a mrazení tkáně

Odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky. Množství ovariální tkáně odebírané pro účely kryokonzervace je část ovariální kúry o rozměrech cca 10 × 20mm a tloušťce 1-2mm, nejlépe z obou ovarii. Tkáň ovariálního kortexu je vložena do kultivačního média a transportována do embryologické laboratoře ke zpracování. V laminárním boxu je tkáň vyjmuta na Petriho misku, přelita médiem a nařezána skalpelem na úzké proužky o rozměrech zhruba 2 × 4 × 1 mm (obr. 5). Poté jsou proužky umístěny do ekvilibračního média (fosfátový pufr, PROH a sacharóza). Po inkubaci jsou vloženy po čtyřech až šesti do označených kryotub (Nunc) naplněných kryokonzervačním médiem. Vlastní kryokonzervace může být provedena jak technikou pomalého zmrazování za použití automatického mrazicího zařízení, tak metodou vitrifi-

kace. Tkáň je potom uložena do kontejnerů ke skladování. Po úspěšném vyléčení onkologických pacientek může být tkáň rozmrazena a použita k ortotopické nebo heterotopické transplantaci.

### Délka skladování buněk a tkání

Doba skladování není pro žádný typ buněk a tkání striktně určena. Měla by však být na pracovišti stanovena, aby nevznikaly organizační, etické a právní problémy. Teoreticky je neomezená, protože při skladování neprobíhají žádné biologické aktivity. Prakticky není známo, jak dlouho mohou buňky zůstat v těchto podmínkách životaschopné. Literární údaje o doposud úspěšně rozmrazených oocytech, embryích a spermích uvádějí, že prokázaná doba skladování, během níž si reprodukční buňky uchovávají schopnost vývoje, je pro oocyty 4 roky [18], pro embrya až 12 let [19] a pro spermie 28 let [20].

### Kryokonzervace a legislativa

Zákon 296/2008 Sb., o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka (zákon o lidských tkáních a buňkách), a vyhláška 422/2008 Sb., o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka, ukládá povinnost provést vždy před zmrazením biologického materiálu sérologické vyšetření z důvodu zhodnocení rizika křížové kontaminace. Před uložením buněk a tkání do kryobanky je nutno vyšetřit HIV 1 a 2 (anti-HIV-1, 2), hepatitidu B (HBsAg, anti HBc), hepatitidu C (anti-HCV-Ab) a syfilis.

Zamrazený materiál je do doby získání negativních výsledků umístěn v karanténě. Po prokázání seronegativity je přemístěn do skladovacího kontejneru. V případě positivity na některou infekci je materiál skladován odděleně v infekčním kontejneru. O všech krocích je veden písemný záznam.



## Závěr

Kryokonzervace buněk a tkání má široké a nezastupitelné využití pro páry podstupující léčbu metodami asistované reprodukce, ať už se jedná o jejich vlastní, nebo darovaný biologický materiál. Nabízí také šanci na zachování reprodukčních funkcí pro onkologicky nemocné, kteří mohou využít zamrazení spermií, oocytů, embryí nebo ovariální tkáně před zahájením onkologické léčby.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NS/9661-4.*

## Literatura

- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164(4172): 666.
- Lovelock JE, Polge C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J* 1954; 58(4): 618-622.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -289 °C. *Science* 1972; 178: 411-414.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305(5936): 707-709.
- Zeilmaker GH, Alberda A, Van Gent I. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984; 42(2): 293-296.
- Product Catalog COOK Medical. Assisted reproductive technology 2009: 1-72.
- ORIGIO Product Catalog, Medicult media, Humagen Pipets and MidAtlantic Devices. Version 1. March 1. 2010. Available from: <http://viewer.zmags.com/publication/9945a62a#/9945a62a/1>.
- Žáková J, Ventruba P, Crha I et al. Sperm Donation Programme at the Centre of Assisted Reproduction in Brno: 1995-2005 results. *Scripta Medica Brno* 2005; 6: 323-328.
- Crha I, Ventruba P, Žáková J et al. Kryokonzervace spermatu před gonadotoxickou léčbou - 11 let zkušeností. *Česk Gynek* 2007; 72(5): 320-326.
- Crha I, Ventruba P, Žáková J et al. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil Steril* 2009; 91(6): 2344-2348.
- Crha I, Kralíková M, Melounová J et al. Seminal plasma homocysteine, folate and cobalamin in men with obstructive and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27(9-10): 533-538.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001; 76(5): 892-900.
- O'Connell MO, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2001; 17(3): 704-709.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; 1(8486): 884-886.
- Tucker MJ. Human oocyte and embryo cryopreservation. The Past and Science of Assisted Reproductive Techniques. London, New York: Taylor & Francis 2004.
- Huser M, Crha I, Hudeček R et al. Ovarian tissue cryopreservation - new opportunity to preserve fertility in female cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28(4): 249-255.
- Huser M, Crha I, Ventruba P et al. Prevention of ovarian function damage by a GnRH analogues during chemotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Hum Reprod* 2008; 23(4): 863-868.
- Parmegiani L, Garelo C, Granella F et al. Long-term cryostorage does not adversely affect the outcome of oocyte thawing cycles. *Reprod Biomed Online* 2009; 19(3): 374-379.
- Revel A, Safran A, Laufer N et al. Twin delivery following 12 years of human embryo cryopreservation: case report. *Hum Reprod* 2004; 19(2): 328-329.
- Feldschuh J, Brassel J, Durso N et al. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril* 2005; 84(4): 1017.

*Doručeno do redakce: 6. 12. 2010  
Přijato po recenzi: 31. 1. 2011*

**as. RNDr. Jana Žáková, Ph.D.**  
Gynekologicko-porodnická klinika  
LF UK a FN Brno  
jzakova@fnbrno.cz

## **PUBLIKACE XI**

## FACTORS INFLUENCING EFFECTIVENESS OF CRYOPRESERVED/THAWED EMBRYO TRANSFER

ŽÁKOVÁ J., VENTRUBA P., PETRENKO M., VIŠŇOVÁ H., PELÍŠKOVÁ L.

First Department of Gynaecology and Obstetrics, Medical Faculty, Masaryk University, Brno

### Abstract

A retrospective analysis of factors influencing the success of frozen-thawed embryo transfers was carried out.

The frozen embryo transfers (FET) provided from January to December 1996 (Group I) and in the period from January to August 1997 (Group II) were evaluated. Transferred embryos were frozen during the years 1994–1997 at Planer Kryo 10/1.7. As a cryoprotectant 1.5 M 1,2-propanediol and sucrose were used. All morphologically quality embryos were frozen during the years 1994–1995. From the beginning of 1996 only embryos with a maximum of 30% of fragments were frozen. The storage duration before thawing lasted from 2 to 21 months.

In 1996 (Group I) FET was performed in 34 patients from 39 monitored cycles (87.2 %). The thawed embryos of the rest of the patients were not suitable for FET. In 53.7 % of transferred embryos more than 50 % of blastomeres survived. Three clinical pregnancies were achieved, i.e. 8.8 % preg. rate. The average storage time was 5.9 months in the patients who became pregnant after FET and 6.6 months in those without pregnancy.

In 1997 (Group II) FET was performed in 32 patients (64.0 %) from 50 monitored FET cycles. Only embryos with a minimum of 50 % of surviving blastomeres were transferred. Seven clinical pregnancies were achieved, i.e. 21.9 % preg. rate. The average storage time was 8.4 months in the patients who become pregnant after FET and 8.2 months in those without pregnancy.

We can conclude that the improvement of the results after FET was reached both by the cryopreservation of only good quality embryos and by transferring only embryos with a minimum of 50 % of survived blastomeres. The result of transfer was influenced neither by the length of the cryopreserved embryo storage nor by the gynecologist transfer technique.

### Key words

cryopreservation, frozen, thawed, embryo, transfer, blastomere

### INTRODUCTION

Cryopreservation of human embryos is an integral part of the *in vitro* fertilization (IVF) programme. Human preimplantation embryos can be frozen and stored in liquid nitrogen from the zygote to the blastocyst stage with subsequent survival. The first pregnancy from transfer of a frozen-thawed embryo was achieved in Australia in 1983 (*Trounson and Mohr, 1983*).



There are many reasons for embryo cryopreservation. To reduce the risk of multiple pregnancy, the optimal number are three embryos per transfer. The supernumerary embryos are cryopreserved and can be used for the next transfer. In this way one or more births from one oocyte retrieval can be gained, even after a long period of storage. Embryo freezing can also contribute to lowering the risk of severe ovarian hyperstimulation by cancelling the fresh transfer. Embryo freezing is suitable for embryo rescue in case of inflammation, fever or technical problems during the transfer procedure as well as for circumventing the difficulties of synchrony between the ovarian cycles of donor and acceptor patients in an oocyte donation programme. Cryopreservation for the rescue of gametes and embryos before radio- or chemotherapy can also be successfully used.

The aim of our study was a retrospective analysis of the factors influencing the success of frozen-thawed embryo transfer (FET).

## MATERIALS AND METHODS

### **1. Evaluated groups**

Frozen/thawed embryotransfer (FET) provided at our clinic from January to December 1996 (Group I) and from January to August 1997 (Group II) were evaluated. Embryos of all morphologic quality stages were frozen during the years 1994 and 1995. From the beginning of 1996 only embryos with a maximum of 30% of fragments were frozen.

### **2. Embryo preparation for freezing**

Embryos were frozen during 1995–1997 using 1.5 M propanediol and 0.1 M sucrose as described by Testart et al. (1986). At room temperature embryos were transferred into phosphate-buffered saline (PBS) + 20% serum for 15 minutes, then to 1.5 M PROH in PBS + 20% serum for 15 minutes, and to 1.5 PROH + 0.1 suc. + 20% serum for 5 minutes.

### **3. Method of cryopreservation**

Embryos were frozen in a freezer Planer Biomed Kryo 10/1.7. at -20 °C/min from room temperature to 70 °C when seeding was induced. Then cooling continued at -0.30 °C/min to -30 °C, and then at -50 °C/min to -150 °C.

### **4. Cryopreserved embryo storage**

Embryos were stored in vessels MVE xc 34/18 (fy Planer) with liquid nitrogen. The duration of storage before thawing lasted from 2 to 21 months.

### **5. Patients' preparation for FET**

FETs were provided in natural cycles. The hormonal levels and ultrasound findings were monitored in each patient. Ovulation was induced by the administration of human chorionic gonadotropin (5000 - 10000 IU, Pregnyl, fy Organon). FETs were performed from day 17 to 19 of the menstrual cycle. A minimum endometrial thickness of 10 mm was required.

### **6. Embryo thawing and transfer**

Embryos were thawed on the day of replacement at room temperature. Propanediol and sucrose were removed in three steps and after washing several times in culture IVF medium embryos were placed in culture IVF medium (Medi-Cult). FETs from 2 to 6 hours after thawing with either K-TFCT-3020 reproductive transfer catheter or K-SOFT-3031 soft trans set (fy COOK) were carried out. Transfers were performed by four gynecologists.

## RESULTS

In 1996 (Group I) FET was performed in 34 patients from 39 monitored cycles (87.2%), and 3 clinical pregnancies were achieved, i.e. 8.8% pregnancy rate. In 1997 (Group II) FET was performed from 50 monitored FET cycles in 32 patients (64.0%). Only embryos with a minimum of 50% of surviving blastomeres were transferred. Seven clinical pregnancies were achieved, i.e. 21.9% pregnancy rate (*Table 1*).

The total number of survived embryos after thawing was 76.5% in Group I and 83.8% in Group II. The percentage of good quality surviving embryos with a minimum of 50% of intact blastomeres was higher in Group II (69.0%) than in Group I (42.5%).

In both groups the same average number of thawed embryos was transferred (2.8 embryos per transfer). A significant difference is that only embryos with more than 50% of survived blastomeres were replaced in 1997. In contrast to that only 53% of replaced embryos in 1996 had more than 50% of intact blastomeres (*Table 2*).

The total storage time was two months longer in Group II than that in the first evaluated period (Group I). Within both groups there was no difference in average storage time in pregnant and non-pregnant patients after FET (*Table 3*).

The influence of the gynecologist transfer technique on the result of transfer was not established due to a low number of cases (*Table 4*).

*Table 1*

Result of Frozen Thawed Embryo Transfers (FET)		
1st Clinic Gynaec./Obstet.	1996	1997
Monitored cycles	39	50
FET cycles	34 (87.2 %)	32 (64.0 %)
Clinical pregnancies	3	7
Clinical pregnancy rate	8.8 %	21.9 %

*Table 2*

The Comparison of Thawed, Survived and Transferred Embryos Status

	Group I 1996	Group II 1997
Thawed embryos	157	154
Survived embryos	120 (76.5 %)	129 (83.8 %)
≥ 50 % of blastomeres	<b>51 (42.5 %)</b>	<b>89 (69.0 %)</b>
Transferred embryos	95	89
≥ 50 % of intact blastomeres	<b>51 (53.7 %)</b>	<b>89 (100.0 %)</b>
Number of embryos per FET	2.8	2.8
≥ 50 % of intact blastomeres per FET	1.5	2.8

*Table 3*  
Storage Time of Frozen Embryos

	1996 (months)	1997 (months)
+ pregnancy after FET	5.9	8.4
- pregnancy after FET	6.6	8.2
Average time of storage	6.3	8.3

*Table 4*  
Influence of Transfer Technique on the FET Results

	1996	1997	Totally	
	ET/preg. n / n	ET/preg. n / n	ET/preg. n / n	preg./ET %
Gynecologist 1	7/1	9/2	16/3	<b>18.8</b>
Gynecologist 2	7/0	6/2	13/2	<b>15.4</b>
Gynecologist 3	10/0	6/2	16/2	<b>12.5</b>
Gynecologist 4	10/2	11/1	21/3	<b>14.3</b>

#### DISCUSSION

The method of cryopreservation and thawing embryos is a key factor of success. Three basis cooling protocols were described, each was designed for a specific cell stage embryo and cryoprotectant combination. For pronucleated and 2- or 3 day old embryos, either 1,2-propandiol (*Lassalle et al.*, 1985) or dimethylsulfoxide (*Fehilly et al.*, 1958) is used. The most suitable for blastocysts is glycerol (*Cohen et al.*, 1985).

As we changed neither the cryoprotectant nor the cooling programme throughout the evaluated period (*Žáková et al.*, 1996 a, b), the cryopreservation technique is not the main result influencing factor in our study.

From our evaluated factors we have concluded that the morphologic appearance of the embryo before freezing is important for FET results. We recommend to cryopreserve only embryos with a maximum of 30% of fragments and in this way increase the number of good quality embryos after thawing. Another important step is to transfer only embryos with a minimum of 50% of viable blastomers.

The differences in storage duration are not clinically significant. We consider it essential that the various length of storage time has no influence on the pregnancy rate. Led by this experience we can cancel the previously recommended minimal three months period. *Mandelbaum et al.*, (1988) reported their experience with various duration of embryo storage from 1 to 6 years. Survival rates



were identical during the first four years (60% to 68%). After the fourth year of storage, however, they observed a significant decrease in the survival rates of cryopreserved embryos (47%) which could not be explained by impaired embryonic quality before freezing.

The influence of the transfer technique of each gynecologist on the FET results cannot be determined due to the low number of cases.

By means of cryopreservation and transfer of good quality embryos after thawing we can reach the same results as those after fresh embryo transfers (Žáková *et al.*, 1997). In this way we can lower the number of transferred embryos in stimulated cycles and cryopreserve the rest of them. The cumulative pregnancy index from one stimulated cycle is then considerably higher than pregnancy reached from transfer without the limitation of transferred embryos.

The utilization of cryopreservation is very important for couples with a severe andrological factor of sterility, where it is necessary to provide intracytoplasmatic sperm injection (Ventruba *et al.*, 1997). Even more important is cryopreservation of those embryos arisen from fertilization with sperms obtained microsurgically from epididymis or testicular tissue (Crha *et al.*, 1997). In these cases the possibility of multiple transfer from one sperm retrieval has its extraordinary contribution.

The possibility of embryo cryopreservation decreases the necessity of stopping good quality embryo cultivation, and decreases the risk of multiple pregnancy. This problem has been studied within a grant project where we endeavour to minimize risks of assisted reproduction. These rules are ethically fully acceptable and approved by the Ethic Board of ESHRE and FIGO.

*Žáková J., Ventruba P., Petrenko M., Višňová H., Pelíšková L.*

#### FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ EFEKTIVITU TRANSFERU ZMRAŽENÝCH / ROZMRAŽENÝCH EMBRYÍ

##### S o u h r n

Provedli jsme retrospektivní rozbor příčin, které mohou ovlivnit úspěšnost transferu zmražených / rozmražených embryí.

Byly hodnoceny kryo-embryotransfery (KET) provedené od ledna do prosince 1996 (soubor I) a v období leden až srpen 1997 (soubor II). Transferovaná embrya obou souborů byla zamražována v průběhu let 1994 - 1997 na zařízení Planer Kryo 10/1.7. Jako kryoprotektivum byl použit 1,5 M 1,2-propandiol a 0,1 M sacharóza. V letech 1994 - 1995 byla mražena embrya bez rozdílu morfologické kvality. Od začátku roku 1996 byla zamražována pouze embrya s max. 30% fragmentů. Délka skladování před rozmražením se pohybovala v rozmezí 2 - 21 měsíců. Stimulace byla prováděna standardním způsobem a v obou souborech se nelišila.

V souboru I byl KET proveden u 34 pacientek z připravovaných 39 KET cyklů (87,2%). U ostatních nebyla embrya po rozmražení vhodná k transferování. U 53,7% transferovaných embryí přeživalo více než 50% blastomer. Bylo dosaženo 3 klinických těhotenství, tj. 8,8% těhot./KET. Průměrná doba skladování zmražených embryí byla 5,9 měsíců u pacientek, které po KET otěhotněly a 6,6 měsíců u pacientek bez gravidity.

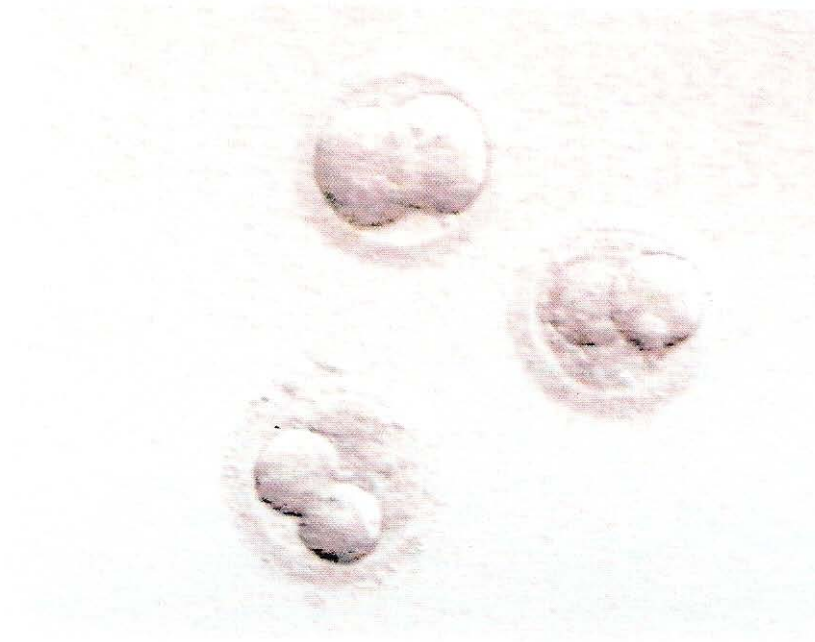
V souboru II byl KET proveden u 32 z 50 připravovaných pacientek (64,0%). Transferovaná byla pouze embrya s 50 a více procenty přežívajících blastomer. Bylo dosaženo 7 klinických těhotenství, tj. 21,9% těhot./KET. Průměrná doba skladování byla 8,4 měsíců u pacientek s následnou graviditou a 8,2 měsíců u pacientek bez gravidity.

Můžeme konstatovat, že zlepšení výsledků po KET bylo dosaženo jednak zmražováním pouze kvalitních embryí a jednak transferováním embryí s minimálně 50% přežívajících blastomer. Délka skladování zmražených embryí ani technika transferu jednotlivých gynekologů neměla patrně na výsledek transferu vliv.

#### REFERENCES

1. Cohen J., Simons R. F., Edwards R. G., Fehilly C. B., Fishel S. B.: Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 2, 1985, pp. 56–64.
2. Crha I., Ventruba P., Žáková J., Pacik D., Turjanica M.: Azoospermia treatment by intracytoplasmatic sperm injection (ICSI) with MESA or TESE technique. Xth World Congress of IVF and Assisted Reproduction, Monduzzi Editore, Bologna, Italy 1997, pp. 517–521.
3. Fehilly C. B., Cohen J., Simons R. F., Fishel S. B., Edwards R. G.: Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study. *Fertil Steril.*, 44, 1985, pp. 638–644.
4. Lassalle B., Testart J., Renard J. P.: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil. Steril.*, 44, 1985, pp. 645–651.
5. Mandelbaum J., Junca A. M., Plachot M., Alnot M. O., Salat-Baroux J., Alvarez S., Tibi C., Cohen J. et al.: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod.*, 3, 1988, pp. 117–119.
6. Testart J., Lassalle B., Belaisch - Allart J., Hazout A., Forman R., Rainhorn J. D., Frydman R.: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil. Steril.* 46, 1986, pp. 268–276.
7. Trounson A., Mohr L.: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305, 1983, pp. 707–709.
8. Ventruba P., Žáková J., Crha I., Němcová S.: Intracytoplasmatická injekce spermie do oocytu a asistovaný hatching – mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. *Prakt. Gyn.* 1, 1997, pp. 14–25.
9. Žáková J., Ventruba P., Crha I.: Cryopreservation of gametes and embryos in human in vitro fertilization programme. 42nd International Congress of the European Tissue Culture Society. Manual of the International Workshop on Techniques in Cryopreservation, 1996 a.
10. Žáková J., Ventruba P., Crha I., Němcová S.: Cryopreservation of human gametes and embryos in assisted reproduction. Abstracts of the First Central European Congress of cryosurgery, Plzeň 1996 b, P4.
11. Žáková J., Ventruba P., Crha I., Pelišková L., Němcová S., Nentwichová P.: Faktory ovlivňující efektivitu transferu rozmražených embryí. *Asistovaná reprodukce*, 7, 1997, 2, pp. 10–12.

*Supported by Ministry of Health, Czech Republic, Grant No 3804-3.*



*Fig. 1:*  
Embryos after thawing with minimum 50 % of surviving  
blastomers before transfer



## **PUBLIKACE XII**

# Dárcovství gamet - biologické, legislativní a etické aspekty

Čes. Gynek.  
62, 1997, č. 2  
s. 72 - 75

I. Crha<sup>1</sup>, P. Ventruba<sup>1</sup>, T. Mardešić<sup>2</sup>, J. Žáková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. gynek.-porod. klinika LF MU, Brno, přednosta doc. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

<sup>2</sup>Sanatorium Pronatal, Praha, vedoucí MUDr. T. Mardešić, CSc.

Dárcovství gamet má v paletě metod asistované reprodukce své důležité místo. S vývojem reprodukční medicíny došlo i v této oblasti k výrazným změnám. Rozvoj IVF (in vitro fertilizace) umožnil využít při terapii neplodnosti darované oocyty a počet žen odkázaných na tento postup stále narůstá. Na druhé straně zavedení intracytoplasmatické injekce spermií (ICSI = IntraCytoplasmatic Sperm Injection) snižuje počet případů indikovaných pro dárcovství spermií. Svým charakterem je dárcovství zárodečných buněk spojeno s řadou otázek etických a legislativních. Nesmírně důležité jsou i vlastní biologické aspekty postupů a praktik používaných při dárcovství gamet [6].

Cílem tohoto příspěvku je uvést jednak současné názory na tuto problematiku, jak byly diskutovány na 12. výroční schůzi Evropské společnosti pro lidskou reprodukci a embryologii ESHRE v Maastrichtu v červnu 1996 a upozornit na současný stav v ČR.

Etické principy by měly být v souladu s legislativou, která je pak základem pro praktické provádění. V tomto pořadí je proto také problematika uspořádána.

## 1. Etické principy

Základní etická pravidla je možno rozdělit do tří hlavních okruhů:

### 1.1. Získávání dárců

Při rekrutování dárců jsou etickými komisemi všeobecně přijímána hlediska zdravotního stavu dárce. Při použití nezdravotních hledisek (např. psychologické vyšetření, výběr podle požadavků budoucích rodičů aj.) vznikají námitky, zda tímto způsobem již nemůže docházet k eugenickému screeningu.

### 1.2. Finanční odměna dárců

Problematika platby dárců je předmětem až filosofických diskusí - samo slovo dárce vylučuje platbu. Důležité je správné nastavení tohoto parametru tak, aby byla zřejmá hranice mezi komerční a nekomerční sférou. Uplatňují se zde tyto názory:

- Jestliže je darování gamet chápáno jako darování orgánů, platba není etická. Náhrada nákladů dárce je však přijatelná.

- Darování gamet může zvyšovat riziko přenosu chorob. Platba může přilákat jedince s vysokým

rizikem přenosu těchto chorob, např. HIV u osob závislých na drogách.

### 1.3. Zájmy a práva budoucího dítěte

V této oblasti jsou uvedeny jen některé z otázek, na které se obtížně hledá objektivní odpověď [7, 8].

- Má být asistovaná reprodukce omezena na případy jen medicínské nutnosti?

- Jak rozhodnout v oblasti nemedicínských případů osaměle žijící ženy nebo lesbické dvojice?

- Jak zvážit argument, že není v zájmu dítěte být narozeno mimo tradiční rodinu?

- Má dítě právo znát identitu svého biologického rodiče? - Znamená to, že rodiče, kteří nebudou ochotni přiznat dítěti úlohu dárce mají být z těchto programů vyloučeni?

- Jak správně posoudit práva a zájmy potenciálního dítěte?

- Je možné říct, že není v zájmu dítěte být narozeno rodičům, kteří mu nepřiznají jeho pravý původ?

## 2. Dárcovství gamet a legislativa

Mezi evropskými státy existují výrazné rozdíly týkající se zákonů upravujících manipulaci s gametami a jejich dárcovstvím [2]. Důležitými faktory jsou omezení pro dárce, platba, pravidla pro vyšetření dárců, zásady pro posouzení recipientů a anonymita. Stručný přehled je uveden v tabulce 1.

V Evropě existuje konsenzus v těchto zásadách:

a) Použití dárcovství gamet u neplodných dvojic, které léčbu potřebují a které s ní souhlasí.

b) Platba je obecně považována za nepřijatelnou. Výjimkou je krytí nákladů, což je v souladu s principem nevyužití lidského těla a jeho produktů ke komerčním účelům.

c) Respektování zájmu a dobrých podmínek vývoje potenciálního dítěte.

## 3. Praktické zásady pro dárcovství gamet

Předkládané zásady vychází z jednání multidisciplinární skupiny expertů Evropského společenství v letech 1993 až 1995. Je uznáváno, že naprostá uniformita regulačních opatření nebyla cílem těchto jednání. Programy dárcovství gamet by však měly respektovat určité minimální požadavky tak, aby byla zajištěna bezpečnost a dobrá

Tab. 1. Existence nebo absence zásad pro dárcovství spermatu a oocytů. (\*BAS = British Andrology Society)

Stát	Omezení pro dárce	Platba	Vyšetření dárce	Požadavky na recipienty	Anonymita	Počet potomků
Dánsko	probíhá revize			souhlas partnera	nutná pro oocyt, plánované úpravy	
Francie	muž - 45 let, žena bez omezení	jen úhrada ušlé mzdy	HIV, hepatitis, CMV	reprodukční věk, manželé nebo 2 roky spolu	povinná	5 dětí
Norsko	musí být ženatý			vdaná žena mladší 37 let		
Španělsko				bez omezení včetně svobodných žen		
Švédsko	písemný souhlas			manželé nebo 2 roky společného života	dítě má právo na identifikaci biologického rodiče	
Švýcarsko	zakázané v Basileji a Glarus	bez omezení		manželské dvojice	právo na informace o rodičích	10 dětí
Velká Británie	sperma 18-55, oocyt < 35 let	15 liber za odběr	stanoveny předpisy BAS*	přihlíží k zájmům dítěte	dává se přednost anonymitě	10 dětí
Rada Evropy	podle rozhodnutí lékaře	pouze náklady a ušlá mzda		ne pro osamělé ženy a homosexuály		

klinická praxe pro pacienty i dárce. Zásady považované za povinné jsou v přehledu uvedeny slovy „musí být“.

### 3.1. Nábor dárce

a) Dárce musí být informován o použití gamet, maximálním počtu rodin, ve kterých se z jeho gamet mohou děti narodit, o zdravotním riziku při odběru (především u dárkyň oocytů), o související legislativě a postupu při odběru.

b) Centrum od dárce musí získat informovaný souhlas. Donor musí mít možnost kdykoli zrušit svůj souhlas s dalším použitím gamet.

c) Dárce musí být nejméně 18 let star a je vhodné stanovit také horní věkovou hranici. Pro dárce spermatu je doporučen věk do 45 let, u dárkyň oocytů do 35 let.

d) Člen pracovního týmu nesmí být donorem ve věm pracovním centru.

e) Je podporováno anonymní dárcovství (bez identifikačních informací mezi donorem a recipientem). Otázka identifikace dárce poskytnutá potomkům je předmětem debat a v některých státech je stanovena legislativně.

f) Dárcovství gamet by nemělo být motivováno finančně. Je možné hradit nutné výdaje. Pokud je stanovena odměna, je třeba ji omezit tak, aby nebyla primárním důvodem dárcovství.

g) Centra by měla získávat pouze dárce gamet, kteří již mají zdravé děti.

### 3.2. Vyšetření dárce

Lékař musí vyšetřit zdravotní stav a anamnézu dárce, aby se vyloučily přenosné choroby a patologické stavy nepříznivě ovlivňující fertilitu [1, 2].

#### 3.2.1. Riziko infekčních chorob

Při počátečním screeningu musí být negativní následující testy:

a) Sérologie na HIV 1 a 2 (HTLV podle lokální prevalence).

b) Sérologie na syfilis, hepatitidu B a C.

c) Neisseria gonorrhoeae a Chlamydia trachomatis ve spermatu nebo v moči pomocí spolehlivých technik (např. uretrálních tamponů).

Po šesti měsíční karanténě musí být negativní:

- sérologie HIV 1 a 2 (popř. HTLV),

- sérologie na syfilis, hepatitidu B a C.

Dárce musí být testován na cytomegalovirus (CMV), a to při počátečním screeningu a po šesti měsíční kontrole. Jestliže došlo k sérokonverzi, dárce musí být vyřazen. Recipienti séronegativní na CMV musí dostat gamety pouze od séronegativních dárce.

#### 3.2.2. Riziko genetických chorob

Lékař musí cíleně vyšetřit a zajistit rodinnou anamnézu genetických chorob. Doporučuje se stanovení karyotypu a selektivní testování na recesivní genetické choroby s vyšší prevalencí v dané oblasti. Osoby s dědičnými chorobami musí být z dárcovství gamet vyřazeny.

Jestliže je u dárce zjištěno genetické riziko, rozhodnutí o možnosti použít jeho gamety musí být stanoveno ve spolupráci s genetikem.

### 3.3. Technické aspekty dárcovství gamet

a) Centra provádějící program dárcovství gamet musí zajistit nejvyšší možný standard práce se zárodečnými buňkami a jejich skladování [11].

b) Pravidla a postupy manipulace s gametami musí být jasně definovány.

c) Dárcovství gamet musí být prováděno zkušeným pracovním týmem v centrech s nezbytným vybavením.

d) Programy dárcovství gamet by měly provádět multidisciplinární týmy.

e) Musí být zajištěna kontrola kvality laboratorních postupů.



- f) Gamety musí být odebrány v centru.  
 g) Důsledně je třeba dodržovat diskrétnost dárců i recipientů.  
 h) Měla by být možná výměna gamet mezi centry používajícími srovnatelné standardy. Nákup a prodej lidských gamet musí být zakázán.  
 i) Dárcovství spermatu lze provádět jen spermatem kryokonzervovaným nejméně po dobu šesti měsíců. Odpovídající testy na vyloučení přenosu infekčních chorob musí být provedeny na začátku a konci „karantény“.  
 j) Vzhledem k dosud malé úspěšnosti zmrazování oocytů v programu dárcovství gamet jsou většinou center používána zmrazená embrya. Pokud se transferují čerstvá embrya, recipient musí být jasně informován o riziku možnosti přenosu infekční choroby.  
 k) Ve stejném cyklu nesmí být použity spermie nebo oocyty od dvou různých dárců.  
 l) Přesná dokumentace o dárcích musí být vedena samostatně.

### 3.4. Použití darovaných gamet

- a) Recipient musí být informován o metodách nábory dárců, jejich vyšetřování, o možných rizicích léčby, legislativě, postupu provedení a úspěšnosti léčby v daném centru.  
 b) Recipientům musí být nabídnuto poradenství („counselling“).  
 c) Od dárců musí být získán informovaný souhlas.  
 d) Dárcovství gamet nesmí být použito pro eugenické účely.  
 e) Při výběru dárců by měly být respektovány fenotypické charakteristiky donora i recipienta.  
 f) Přestože riziko příbuzenského početí v důsledku darování gamet je extrémně nízké, počet dětí od jednoho dárce by měl být limitován. Z psychologických a sociálních důvodů by tento počet měl být nízký. Vzhledem k tomu, že v jedné rodině může být od jednoho dárce více dětí, měl by být při dárcovství gamet limitován počet těchto rodin.

### 3.5. Hodnocení výsledků léčby

- a) Centrum musí zaznamenávat výsledky léčby a těhotenství dosažená při dárcovství gamet.  
 b) Každé centrum musí poskytnout veřejně údaje o léčbě a její úspěšnosti.  
 c) Důležitá je centrální registrace statistických údajů snadno dostupných pro veřejnost.

## 4. Dárcovství gamet v ČR

V České republice je nutno vycházet z následujících metodických pokynů, zákonů a doporučení: „Metodický návod o vyšetření dárců krve, lidských tkání a spermatu“ Věstníku MZ ČR požaduje vyšetření dárce na aktivitu ALT, přítomnost povr-

chového antigenu viru hepatitidy B, protilátek proti viru hepatitidy C, protilátek proti HIV-1 a infekce *Treponema pallidum*.

V oblasti legislativy platí odstavec 2 § 58 zákona č. 94/1963 Sb. o rodině: „Otcovství k dítěti narozenému v době mezi stoosmdesátým dnem a třicátým dnem od umělého oplodňování vykonaného se souhlasem manžela matky nelze popřít. Otcovství lze však popřít, jestliže by se prokázalo, že matka dítěte otěhotněla jinak.“ [10]. Z toho vyplývá, že důsledky zákona o rodině jsou podmíněny tím, že jde o vdanou ženu žijící v manželství a uměle oplodněnou se souhlasem jejího manžela a nelze tedy extenzivním výkladem presumpci otcovství vztáhnout na jakéhokoli partnera ženy.

V otázce dárcovství oocytů po více než čtyřleté diskusi došlo ke konsenzu, že léčbu sterility pomocí darovaných oocytů stávající platný právní řád jednoznačně umožňuje a byl odbornou společností (Sekcí asistované reprodukce ČGPRS) vypracován materiál „Zásady použití darovaných oocytů v programu in vitro fertilizace“. Tyto zásady následně schválil výbor ČGPRS dne 7. 2. 1995 a byly bez připomínek diskutovány na Centrální etické komisi MZ ČR dne 25. 4. 1995. Odborná komise MZ ČR pro fertilizaci in vitro projednala a schválila návrh výboru sekce asistované reprodukce ČGPRS, že dárcovství oocytů mohou zajišťovat jen plně akreditovaná centra AR, provádějící více než 400 výkonů za rok (připraveno k vydání ve Věstníku MZ ČR).

Minimální standardy pro centra asistované reprodukce zahrnují nejen vybavenost pracoviště, ale i požadavky na odbornou úroveň a složení týmů upravuje metodický návod č. 9/1996 Věst. MZ ČR [5]. Při provádění výkonů asistované reprodukce je nutno respektovat zásady a doporučení SAR ČGPRS, např. maximální počet transferovaných embryí. V dnešní době musí být naší snahou omezit vznik komplikací asistované reprodukce, za které lze považovat vícečetné těhotenství (kromě dvojčet), závažný ovariální hyperstimulační syndrom [4], časně těhotenské ztráty, mimoděložní těhotenství aj. Jedna z našich možností je analýza dat národního registru ART a přijímání doporučení upravujících postupy asistované reprodukce podle nejnovějších poznatků [9].

Uvedený přehled otázek a postojů souvisejících s problematikou dárcovství gamet ukazuje na složitost vymezení pravidel v této oblasti. S mnoha názory komise ESHRE se můžeme ztotožnit, u jiných spíše cítíme, že jejich legislativní prosazení by znemožnilo dárcovství gamet provádět. Příprava příslušných zákonů proto vyžaduje pečlivou přípravu a hledání řešení respektující etické principy i praktickou proveditelnost.

## LITERATURA

1. Barrat, C. L. R.: Sexually transmitted diseases. In: Male Infertility. Chapman and Hall, London, 1996, s. 251-259.
2. British Andrology Society guidelines for the screening of semen donors for donor insemination. Hum. Reprod., 8, 1993, s. 1521-1523.

3. Brule, van den, A. J. C., Hemrika, J., Walboomers, J. M. M., Raaphorst, P.: *Fertil. Steril.*, 59, 1993, s. 1098 až 1104.
4. Crha, I., Ventruba, P., Rejdová, I., Petrenko, M.: Pre-  
vence ovariálního hyperstimulačního syndromu pomocí od-  
lehčovací punkce ovaria. In: Sborník abstrakt celostátní  
konference ČGFS a SGFS: „Současné trendy v gynekolo-  
gické a porodnické praxi“, Praha, 1995, s. 16.
5. Metodický návod č. 9/1996 věst. MZ ČR, s. 2-3.
6. Robertson, E.: *Fertil. Steril.*, 64, 1995, s. 885-894.
7. Schenker, J. G.: *J. assist. Reprod. Genet.*, 9, 1992, s. 411 až  
418.
8. Shenfield, F.: *Hum Reprod.*, 9, 1994, s. 1348-1354.
9. Ventruba, P.: *Asistovaná reprodukce*, 5, 1995, č. 2, s. 3-22.
10. Zákon č. 94-1963 Sb., § 58, odst. 2.
11. Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I.: Cryopreservation of  
gametes and embryos in human in vitro fertilization prog-  
rammes. In: *Manual of Cryopreservation workshop*, Brno,  
April, 1996, s. 1-7.

Projekt byl řešen s finanční podporou IGA MZ ČR reg. č. 3804-3.

*MUDr. I. Crha, CSc.  
I. gynek.-porod. klinika  
Obilní trh 11  
656 77 Brno*

## **PUBLIKACE XIII**



## SPERM DONATION PROGRAMME AT THE CENTRE OF ASSISTED REPRODUCTION IN BRNO: RESULTS FROM 1995-2005

ŽÁKOVÁ J., VENTRUBA P., CRHA I., LOUSOVÁ E.

Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty Hospital, Faculty of Medicine,  
Masaryk University, Brno

*Received after revision December 2005*

### Abstract

Sperm donation has been an integral part of the assisted reproduction programme at the Department of Gynaecology and Obstetrics of Masaryk University and the Faculty Hospital in Brno since 1995. In spite of great progress in the assisted reproduction possibilities the usage of donor sperm has its own irreplaceable place, because there will always exist couples for whom it is a unique solution to beget their own offspring.

During the 10-year period, after fulfilling the specific seminal, microbiological, serological, and genetic requirements, there were sorted out only 65 donors out of 280 donor candidates. More than 4500 samples were cryopreserved and 2800 samples were used for intrauterine inseminations and oocyte in vitro fertilisation.

### Key words

Donor, Semen, Cryopreservation, Sperm, Insemination

### Abbreviations used

ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IUI, intrauterine insemination; IVF, in vitro fertilisation

### INTRODUCTION

When clinicians started to be aware of the fact that azoospermia or very severe oligospermia could not be improved by medical treatment, the idea of creating sperm banks arose. Using donor sperm became an integral part of assisted reproduction. Before the introduction of micromanipulation techniques, mainly the oocyte intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (1), (2), it was the only possibility of reaching one's own child in cases with low sperm count, sporadic sperm, poor motility, immotility, or in a combination of these factors. In spite of markedly reduced usage of donor sperm because of the possibility of obtaining fertilisable sperm from the epididymis (Microepididymal Sperm Aspiration) or the testis (Testicular Sperm Extraction) as well in some cases there remains an irreplaceable place for the donor sperm.

The donor sperm is used to treat couples with azoospermia, severe male factor infertility, significant sperm or seminal abnormalities, in families carrying genetic diseases which may be transmitted by the husband's spermatozoa, in cases of Rh incompatibility, previous failure to fertilise, and in some countries with HIV seropositive males (3).

Efficient cryopreservation and storage of semen samples is an important condition for the sperm bank establishment. The storage duration is not limited. Cryopreservation is known to cause some changes in the sperm morphology, including damage to mitochondria, the acrosome, and the sperm tail. The sperm motility is particularly sensitive, and it is generally accepted that it can be reduced to one half after a cryopreservation/thawing procedure (4,5,6). Due to this fact, it is necessary to choose potential donors with an emphasis on this sperm parameter.

Before becoming donors, all candidates are interviewed and screened by our rules. Sperm is used only after six months of storage, when negative serology is confirmed. The donation is anonymous and free of charge in the Czech Republic. Only the expenses connected with donation are covered for the donor.

The sperm donor programme has a ten years' tradition at our workplace, and our sperm bank belongs to the largest in our republic. Some other centres of assisted reproduction are interested in our donor semen. Sperm is used for intrauterine insemination (IUI), classical in vitro fertilisation of oocytes, or for ICSI.

#### MATERIALS AND METHODS

From the beginning of 1995 to April 2005, 280 prospective donors had been registered in our Centre of Assisted Reproduction. The possibility of becoming a donor was heard of from friends - other donors, from leaflet campaigns in blood transfusion places and residential halls, and from articles published in magazines.

##### *Admission Requiements*

Donor candidates are recruited from 18- to 35-year-old volunteers, of minimally secondary school education with good health status and absence of genetic abnormalities. During the selection, a personal and family medical and genetic history form is completed with the aim to discard potentially inheritable disorders. A questionnaire focused on phenotypic characteristics (hair colour, hair texture, eye colour, height, weight, blood type) and character and interests is also filled out. Before becoming donors, all of them have to pass the semen testing and microbiological, serological and genetic examinations. They are fully informed about anonymity and further details, and provide a signed consent for the use of their gametes.

##### *Requisite Investigations*

###### 1. SEMEN SAMPLES EXAMINATION

Semen samples, collected by masturbation, are examined within 1 hour after ejaculation into a sterile container (abstinence for 2 to 3 days). After liquefaction a semen analysis is carried out - the semen volume, sperm concentration, motility percentage, and sperm morphology are evaluated according to the WHO Manual (7) in a Makler chamber. The minimal semen parameters recommended for the donors are mentioned in *Table 1*.

*Table 1*  
Minimal semen parameters

Volume > 2 ml
Sperm motility > 60% moving actively
Sperm concentration > 50x10 <sup>6</sup> sperm/ml
Sperm morphology normal range
Cryosurvival > 50% of initial motility

## 2. MICROBIOLOGICAL SPERM EXAMINATION

The basic bacteriological examination for anaerobic and aerobic microorganisms and the examination for *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* presence are performed.

## 3. SEROLOGICAL EXAMINATION

Prospective donors are screened for sexually transmitted and infectious diseases by: serological test for syphilis, serum testing for hepatitis B surface antigen, hepatitis C antibody (HCV), serum testing for HIV-1 and HIV-2, and testing for ALT. Blood type and Rh factor are determined. Each sample is cryopreserved for a half-year period and can be used until after a repeated negative test confirmation. If any of the tests mentioned above is positive, the donor must be rejected and offered appropriate counselling and treatment.

## 4. GENETIC EVALUATION

A full family and genetic history is taken, and caryotyping is carried out. The cystic fibrosis carrier status is eliminated.

### *Informed consent*

A donor signs the informed consent form, in which he declares that he is a man without a history of sex with men, and has not injected drugs for non-medical reasons. He knows that he must announce any changes in his state of health, e.g. transmitted sexual diseases, without delay.

### *Anonymity protection*

Sperm donation is anonymous in the Czech Republic. The donor samples are marked by a numerical code. When used, they are transliterated once more. In this way not only anonymity between the donor and the recipient but also between the doctor and the laboratory staff is guaranteed.

The use of donor sperm may be carried out only in a married couple after the informed consent has been signed. The couple can complete a questionnaire respecting the donor characteristics. Phenotype, blood type, and Rh factor are taken into account.

### *Donation and its limits*

The internal rules for donation and its limits have been defined. The donor should come to the semen taking minimally once a week until 20 – 30 sperm samples are cryopreserved or until 8 – 10 children from his sperm were born. This period is called donor cycle.



### *Sperm cryopreservation and storage*

For the semen sample cryopreservation Richardson's medium prepared by ourselves was used from 1995 to 2001. Its base was buffer, glucose, fructose, and sodium citrate. Glycerol was used as a cryoprotectant. Glycine and egg yolk served as a protein source. Since 2000 we have started to perform cryopreservation with commercially produced media from Medi-Cult (Denmark) or IVF Science and/or Vitrolife (Sweden).

Semen is mixed with cryomedium and portioned into plastic tubes. The samples are frozen by one of two methods - either by means of a Planer Kryo F10 programmable equipment by the standard freezing curve or in nitrogen vapour only.

The samples are stored in Dewar vessels in liquid nitrogen. The nitrogen volume is inspected and supplied at the vessels once a week.

### *Sperm thawing and preparation for insemination*

After withdrawing from the Dewar vessel the cryotubes are left at room temperature. The thawed semen is prepared by a swim-up procedure. During rinsing with a preparation medium the cryoprotectant is removed. The total number of motile spermatozoa in the final preparation is calculated.

## RESULTS

The interest to become a donor was shown by 280 candidates 18-5 years old ( $23.6 \pm 3.9$ ) during a decade. On the basis of substandard semen parameters 187 candidates (66.8 %) were refused. Out of 93 candidates invited for microbiological, serological and genetic examinations, 18 did not come. Lack of interest after having learnt the result of the spermiogram was the probable reason. Seven men out of 75, who had passed through a genetic evaluation, presented inconvenient findings. The causes of their rejection were: positive biochemical screening for a metabolic inherited disease (3x), mutation dF508 heterozygote carrier (2x), objectionable karyotype (1x), family genetic load (1x). After passing all the requisite investigations, 65 men (i.e. 23.2 %) became donors out of 280 previous candidates.

### DONOR CYCLE TERMINATION

Out of 65 selected donors only 33 men finished the whole donor cycle successfully. According to the semen taking frequency the donor cycle ranged from 1 to 3 years. The others stopped donating for various reasons:

1. deterioration in the semen quality - in 6 cases decline of concentration and motility, in 7 cases a low quality after the cryopreservation/thawing procedure;
2. seven men stopped at their own request;
3. 12 donors stopped for unknown reason;
4. six donors reached 10 born babies.

### THE NUMBER OF SAMPLES

Since the sperm bank establishment, 4680 semen samples have been cryopreserved. 2819 samples were withdrawn and used up to date. 1233 samples were used for IUI and 916 samples for IVF. 670 samples were not suitable for insemination. Further 4 centres of assisted reproduction from the Czech Republic have been interested in our donors' semen. They have withdrawn 405 samples since the year 2000.

## DISCUSSION

The recruitment and selection of semen donors is a problematic procedure (8). Only relatively few donors are recruited compared with those screened. More than one half of the interested persons (67.0 %) was rejected because of poor sperm quality in the first examination. They were men without any previous experience in this field. This examination may signalise some potential problems to be solved by them in future. Nearly 20 % of men with good sperm parameters did not come any more after the first examination. It can be speculated that it was only a good chance for them to find out their own sperm parameters free of charge, or they changed their minds for various reasons. As no seropositive candidate was met, some could probably belong to those mentioned above. Positive microbiological detection was very rare and antibiotic cure was sufficient for its elimination. Inconvenient genetic screening occurred only in 10 % of the candidates.

The correct functioning of a semen donation programme requires, besides well-established cryopreservation, an exhaustive control of both clinical and legal aspects. The most important aspect is to avoid any transmission of infectious and genetic diseases to the gamete recipients and their progeny (9). The second is the control of the offspring obtained from the donors in order not to exceed the maximum recommended number of newborns. At our Centre we have established a limit of 8 - 10 babies from one donor, while, for instance, Dutch workplaces permit as much as 25 offspring from one donor (10).

It is important to select candidates who donate their gametes from a low risk population for both infectious and genetic diseases and after an adequate selection, to maintain a strict control of blood analyses and microbiological cultures.

On the basis of our observations we may conclude that the application of donated sperm is an extremely safe option for infertile patients where the use of their own gametes is not possible or where a continuous assisted reproduction treatment failed, if all directives are strictly observed. Finally, the patients must be informed about the fact that the total absence of risk by using the donated sperm cannot be completely assured.

For the reasons mentioned above and management intensiveness of the whole donor programme it is more convenient for some private centres to buy cryopreserved samples from our sperm bank.

## CONCLUSIONS

During the 10 years' duration of the sperm donor programme at our Centre, 65 (23.2 %) suitable donors were selected out of 280 candidates after a strict selection and fulfilment of the specific seminal, microbiological, serological and genetic requirements. More than 4500 samples were cryopreserved. About 2000 women from our or other Czech centres wished to use donor sperm for intrauterine inseminations and oocyte in vitro fertilisation. The sperm donation programme has its

irreplaceable place, even if significant progress in assisted reproduction techniques has been achieved, because there will always exist couples for whom it is the only solution to beget their own offspring.

*Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Lousová, E.*

PROGRAM DÁRCOVSTVÍ SPERMATU V CENTRU ASISTOVANÉ REPRODUKCE V BRNĚ:  
VÝSLEDKY 1995 - 2005

Souhrn

Dárcovství spermatu je součástí programu asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky FN a LF MU v Brně od roku 1995. Program dárcovství spermatu má i přes velké pokroky v možnostech a technikách asistované reprodukce své nezastupitelné místo a stále budou existovat páry, pro které je to jediné řešení ke zplození potomka. Za 10 let trvání bylo po splnění všech předepsaných kritérií a spermio-logickém, mikrobiologickém, serologickém a genetickém vyšetření vybráno 65 (23,2 %) vhodných dárců z 280 zájemců o darování. Zamraženo bylo přes 4500 dávek a spotřebováno přes 2800 dávek pro intrauterinní inseminace a in vitro fertilizaci oocytů.

REFERENCES

1. *Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J.* High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1993; 8: 1055-1060.
2. *Ventruba P, Žáková J, Crha I, Němcová S.* Intracytoplasmatická injekce spermií do oocytu a asistovaný hatching - mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. [Intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching - micromanipulation techniques improving fertilisation in vitro success.] *Prakt Gyn* 1997; 1: 14-25.
3. *Garrido N, Zuzuarregui JL, Meseguer M, et al.* Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates. *Human Reprod* 2002; 17: 3142-3148.
4. *Watson PF.* Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 1995; 7: 871-891.
5. *Holt WV.* Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fert Dev* 1997; 9: 309-319.
6. *O'Connell M, McClure N, Lewis SEM.* The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reprod* 2002; 17: 704-709.
7. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
8. *Barratt Ch.* On the accuracy and clinical value of semen laboratory tests. *Human Reprod* 1995; 10: 250-252.
9. *Barrat Ch, Englert Y, Gottlieb C, Jouannet P.* Gamete donation guidelines. The Corsendonk consensus document for the European Union. *Human Reprod* 1998; 13: 500-501.
10. *Janssens MW.* No reason for a reduction in the number of offspring per sperm donor because of possible transmission of autosomal dominant disease. *Human Reprod* 2003; 18(4): 669-671.



## **PUBLIKACE XIV**

# Možnost využití darovaných gamet nebo embryí při léčbě neplodnosti

J. Žáková, P. Ventruba, I. Crha, E. Bulínová, E. Lousová

**Souhrn:** Program dárcovství je na našem pracovišti nedílnou součástí metod asistované reprodukce už od roku 1995, kdy bylo poprvé zahájeno použití dárcovských spermií. Darovaných vajíček (oocytů) začalo být využíváno v roce 1997 a embryí od roku 1999. Tato možnost je nabízena párům, u kterých z mnoha závažných příčin nelze dosáhnout těhotenství vlastními zárodečnými buňkami. Darování spermií nebo embryí je určeno pouze pro manželské páry, darovaných vajíček mohou využít i páry partnerské. Indikace pro příjemce, výběr dárců a požadavky na ně jsou shrnuty v této práci.

**Klíčová slova:** dárcovství – spermie – vajíčko – oocyt – embryo – asistovaná reprodukce

**Summary:** The possibility of donated gametes or embryos usage in infertility treatment. Donor programme has been an integral part of assisted reproduction methods at our workplace since 1995, when donor sperm was used as the first. Donor eggs we started to use in 1997 and donor embryos in 1999. This possibility is offer to that couples who from some major problem cannot reach pregnancy with their own gametes. Donated sperm or embryo can be provided only to wedded pairs, donor eggs also to partner pairs. Indications for reception donated gametes, selection of donors and medical requirements on them are summarized in this paper.

**Key words:** donation – sperm – egg – ovum – embryo – assisted reproduction

## Úvod

Léčba sterility pomáhá stovkám žen a mužů dosáhnout vlastního dítěte. Pro páry, které z mnoha důvodů nemohou dosáhnout těhotenství vlastními gametami, nabízí asistovaná reprodukce (AR) možnost mít potomstvo díky programu dárcovství vajíček, spermií nebo embryí.

Myšlenka na darování spermií a založení spermabank vznikla, když se ukázalo, že muži s azoospermii nebo těžkou oligospermii nemohou být vyléčeni tak, aby mohli mít své vlastní dítě. Až do nástupu mikromanipulačních technik oplazování [1,2] byly dárcovské spermie jedině řešení v případech výrazně nízkého počtu až ojedinělých spermií, spermií s omezenou pohyblivostí až nepohyblivých, nebo při kombinaci obou faktorů (koncentrace a motility). Na našem pracovišti byla založena spermabanka v roce 1995.

Dárcovství oocytů a embryí se rozvinulo s možností a rutinním zavedením kryokonzervace embryí. Oocyty jsou určeny ženám s omezenou tvorbou vlastních vajíček, nebo v případech rizika přenosu závažných vývojových vad [3]. Prvního těhotenství po oplození darovaného oocytu bylo ve světě dosaženo v roce 1984 [4]. Při kombinaci těchto příčin s andrologickým nebo genetikým faktorem u muže, řeší tuto situaci darovaná embrya [5]. Darovaných vajíček začaly pacientky našeho centra využívat v roce 1997 a embryí od roku 1999 [6].

Dárcovství gamet i embryí je v ČR bezplatné, dárci dostávají pouze kompenzaci výloh spojených s darováním (cestovné, ušlá mzda atd). Anonymita dárců a příjemců u nás zů-

stává přísně zachována. Dárci i příjemci jsou podrobně informováni o postupech, problémech a rizicích spojených s darováním a přijetím a podepisují informovaný souhlas.

## 1. Dárcovství spermatu

### Indikace

Indikací pro využití spermií dárcce je azoospermie manžela nebo vysoké procento morfologicky abnormálních spermií v ejakulátu. Dále je to v případě vážných geneticky vázaných chorob nebo v případě imunologické příčiny neplodnosti páru. Může to být řešením po opakovaných neúspěších technik AR se spermatem manžela v některých zemích i pro páry s HIV-pozitivitou jednoho z nich.

### Dárce

Kritéria pro přijetí jsou věk mezi 18 a 35 lety, minimálně středoškolské vzdělání a dobrý zdravotní stav. Se zájemcem je sepsána rodinná a osobní anamnéza a je s ním vyplněn dotazník zaměřený na fenotyp a povahové rysy, je zaznamenána krevní skupina a Rh-faktor. Nezbytnou podmínkou pro přijetí je splnění podmínek spermio-logického vyšetření – spermio-gram je hodnocen dle Manuálu WHO [7] a námi požadované parametry jsou objem ejakulátu více než 2 ml, koncentrace spermií více než 50 mil/ml, více než 60 % pohyblivých spermií, normální parametry morfologie a více než 50 % udržení původní motility po zmražení a rozmražení. Další podmínkou je negativní mikrobiologické vyšetření – provádí se základní bakteriologické vyšetření na aerobní a anaerobní mikroorganismy a na přítomnost Ureaplasma

urealyticum a Mycoplasma hominis. Dárce dále podstupuje sérologické testy na syfilidu, HBsAg, HCV, HIV-1,2, ALT. Po genetické konzultaci je stanoven karyotyp a vyloučeno nosičství cystické fibrózy. Po úspěšném absolvování všech výše uvedených vyšetření je dárce zařazen do databáze naší spermabanky.

Sperma dárců je po každém odběru zamraženo a uchováváno v kontejnerech s tekutým dusíkem. Vzorky jsou používány až po půlroční karanténní lhůtě, po níž jsou zopakovány testy na HIV1,2.

## 2. Dárcovství oocytů

### Indikace

Darované oocyty jsou řešením pro ženy s poruchami folikulogeneze, primární amenoreou, předčasným ovariálním selháním a po skončení fertillního období. Významnou pomocí je pro ženy s genetikou zátěží, zvláště Turnerovým syndromem a v případě rizika přenosu závažné genetické vady. Opakovaný neúspěch metod AR, nekvalitní vlastní oocyty, nebo opakované fragmentace





embryí z nich vzniklých jsou rovněž důvody k využití oocytů dárkyně.

#### Požadavky na dárkyni

Dárkyni oocytů může být zdravá žena ve věku 18 až 35 let, která splňuje kritéria sérologického vyšetření (negativita HbSAg, HIV1,2, BWR, HCV, screening STD) a genetického vyšetření (anamnéza, karyotyp). Je s ní sepsána rodinná a osobní anamnéza, vyplněn dotazník zaměřený na fenotyp a povahové rysy a je stanovena krevní skupina a Rh-faktor [8].

Na našem pracovišti máme 2 typy dárkyň. Jsou to jednak dobrovolné dárkyně „zvenku“, což jsou ženy hormonálně stimulované pouze pro účel darování. Na tyto ženy máme požadavek, aby byly matkami alespoň jednoho zdravého dítěte. Druhým typem dárkyň jsou ženy z programu AR, které mají vyšší počet vajíček, tzv. oocyte sharing. Jsou to převážně ženy, které se léčí pro sterilitu partnera.

#### Příprava dárkyň

Dárkyně podstupují ovariální stimulaci gonadotropiny v kombinaci s GnRH-agonisty nebo antagonisty. Stimulace je monitorována ultrazvukově a hormonálně. Odběr oocytů probíhá vaginální punkcí folikulů pod kontrolou ultrazvuku.

#### Oplození oocytů a transfer embryí

Získané oocyty jsou oplozovány buď čerstvým, nebo zmrazeným spermatem. Výhoda kryokonzervace spermatu partnera předem spočívá v okamžité možnosti sperma použít v případě nečekaně darovaných oocytů. Je-li spermioqram dobrý, probíhá klasické oplození přidáním vypočteného množství spermií k oocytům. V případě nízkých hodnot koncentrace spermií nebo snížené motility probíhá oplození intracytoplazmatickou injekcí spermií do cytoplazmy oocytu (intracytoplasmic sperm injection – ICSI).

Následuje buď zmrazení vzniklých embryí a skladování v tekutém dusíku do doby použití, nebo transfer čerstvých embryí.

Transfer pouze zmrazených/rozmrázených embryí se prováděl až do roku 2001. Embrya byla zmrazena na dobu 6 měsíců, po jejichž uplynutí byly u dárkyně zopakovány testy na HIV1,2. V případě opětovné negativy výsledků testu byla embrya použita k transferu. Vzhledem k tomu, že úspěšnost čerstvých transferů je vyšší než kryoembryotransferů, začaly se provádět „čerstvé“ transfery. Jejich podmínkou je negativní genetické a negativní aktuální sérologické vyšetření dárkyně a podpis informovaného

souhlasu příjemkyně, ve kterém je seznámena s možným rizikem přenosu HIV bez dodržení půlroční karanténní lhůty.

#### Příprava příjemkyně

Příjemkyně jsou jednak ženy, které mají zachovaný menstruační cyklus, a jednak ženy bez spontánního menstruačního cyklu. V prvním případě je nutná synchronizace cyklu dárkyně a příjemkyně, tudíž je nutné monitorování spontánního ovulačního cyklu příjemkyně. Období, ve kterém je nutno získat oocyty, je poměrně krátké, a proto vyžaduje dostatek dárkyň.

Ve druhém případě je synchronizace dárkyně a příjemkyně snadnější. Příjemkyně jsou připravovány estradiol valerátem, jehož aplikace může trvat až několik týdnů. Výhodou je tak delší období pro získání dárkyně.

### 3. Dárcovství embryí

#### Indikace

Indikacemi pro přijetí darovaných embryí je kombinace ovariálního a andrologického faktoru neplodnosti, genetická zátěž u ženy i muže nebo opakovaný neúspěch po léčbě metodami AR.

#### Původ embryí

Embrya pro darování jsou jednak vytvářena de novo oplozením darovaných oocytů spermiemi dárce nebo jsou darována páry z programu AR. Jedná se buď o páry, které již dosáhly dítěte a nadpočetná zmrazená embrya poskytl k darování, nebo páry, které o svá zmrazená embrya nemají již z nejrůznějších důvodů zájem a písemným souhlasem je poskytli k darování. Dárci embryí musí splňovat stejná kritéria jako dárci spermatu a vajíček.

#### Diskuse

Získávání dárců a dárkyň je náročný úkol. Pouze necelá čtvrtina adeptů na dárce spermatu projde úspěšně náročným sítím předepsaných vyšetření, a je zařazena do databáze dárců. Příčinou nedostatku darovaných oocytů je zvláště časová a fyzická náročnost a případné medicínské riziko, ať už spojené se stimulací vaječnicků, nebo s vlastním odběrem. Do budoucna se dá očekávat, že s trendem oddalování mateřství do pozdějšího věku budou darované oocyty mladých žen stále žádanější. Je třeba mít na mysli negativně se uplatňující genetické faktory, které v souvislosti s věkem výrazně snižují kvalitu vznikajících embryí a které vedou k jejich aneuploidii.

#### Závěr

Program dárcovství je nezbytnou nabídkou centra zabývajícího se léčbou neplodnosti i přesto, že je velmi náročný na organizaci jak vlastních dárců a jejich vyšetření, tak na synchronizaci s příjemci. Je třeba cíleně apelovat na zdravé muže a ženy, aby se stali dárci pohlavních buněk. Darované gamety a embrya znamenají terapeutickou možnost pro páry, u nichž použití jejich vlastních gamet není možné, nebo opakovaně selhává léčba dostupnými technikami asistované reprodukce.

#### Literatura

- Palermo G, Joris H, Derde MP et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1993; 59: 826–835.
- Ventruba P, Žáková J, Črha I, Němcová S. Intracytoplasmatická injekce spermií do oocytu a asistovaný hatching – mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. *Prakt Gyn* 1997; 1: 14–25.
- Serhal PR and Craft LL. Ovum donation – A simplified approach. *Fertil Steril* 1987; 48: 265–269.
- Luijten P, Trounsan A, Kreton J et al. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature* 1984; 307(5947): 174–175.
- Sauer MV, Paulson RJ. Human oocyte and preembryo donation: An evolving method for the treatment of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1421–1424.
- Hudeček R, Ventruba P, Juránková E et al. Terapeutické možnosti asistované reprodukce u perimenopauzálních žen. *Prakt Gyn* 2004; 6: 6–9.
- WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press 1999.
- Guidelines for oocyte donation. *Fertil Steril* 2002; 77(Suppl 5): S6–S8.

RNDr. Jana Žáková, Ph.D.  
prof. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.  
doc. MUDr. Igor Črha, CSc.  
MUDr. Eva Bulínová  
Eva Lousová  
Gynekologicko-porodnická klinika  
FN a MU Brno



## **PUBLIKACE XV**

# Kryokonzervace spermatu před onkologickou léčbou – 7 let zkušeností

Čes. Gynek.  
67, 2002, č. 6  
s. 324 - 328

## Sperm Cryoconservation before Cancer Treatment: 7-year Experience

Crha I.<sup>1</sup>, Ventruba P.<sup>1</sup>, Petrenko M.<sup>1</sup>, Žáková J.<sup>1</sup>, Višňová H.<sup>1</sup>, Kučera M.<sup>1</sup>, Geryk E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gynekologicko-porodnická klinika Masarykovy univerzity a FN Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

<sup>2</sup>Regionální centrum Národního onkologického registru, Masarykův onkologický ústav, ředitel doc. MUDr. R. Vyzula, CSc.

### Structure Abstract

**Objective:** To compare sperm count of cancer patients with health men, to analyze possible relation of sperm pathology and diagnosis of malignant disease and present experience of our cryopreservation programme for cancer patients.

**Design:** Retrospective clinical study.

**Setting:** Department of Obstetrics and Gynecology, Masaryk University, Brno, Czech Republic.

**Methods:** 215 patients (age  $25.4 \pm 5.6$  years) were referred to our unit by oncology specialists for semen cryopreservation before cancer treatment during 1995–2001. Sperm samples were analysed according to guidelines of WHO. Richardson's medium and Planer Kryo 10 were used for standard cryopreservation. Sperm count results were compared to control group of 84 men ( $23.1 \pm 3.6$  year) examined as possible sperm donors. Program SPSS version 9 was used for statistical analysis. Standard intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using frozen spermatozoa was used for infertility treatment following malignant disease recovery.

**Results:** Testicular cancer was diagnosed in 115 (53.5 %) patients, malignant disease of lymphatic and haemopoetic tissue in 75 (34.9 %) cases – out of them 35 (16.3 %) Hodgkin's lymphoma. Twelve men (5.6 %) were treated for osteosarcoma and 13 for other malignant disease. Only 2.8 % patients had normospermia. Severe oligospermia  $< 5$  mil/ml was found in 73 men (33.9 %) including 22 cases of azoospermia (10.2 %) and 12 cases (5.6 %) of cryptozoospermia. 138 (64.2 %) patients had asthenospermia  $< 10$  % of progressive motility, 49 (22.8 %) had teratozoospermia  $< 10$  % spermatozoa with standard WHO morphology. Sperm concentration, progressive motility and morphology were in cancer patients significantly lower ( $P < 0.001$ ) than in control group. Men with testicular cancer had significantly higher frequency of severe sperm pathology. Only 4 patients have returned for assisted reproduction treatment. In all cases ICSI was used, 1 pregnancy and delivery was achieved. During more than 4 years after cryopreservation died 16.6 % of patients.

**Conclusion:** Cancer patients has significantly higher frequency of severe sperm pathologies than healthy men. The most severe sperm pathologies are among men with testicular cancer. Only minority of patients return for fertility treatment. Cryopreserved spermatozoa of cancer patients are able to initiate pregnancy by assisted reproduction techniques.

**Key words:** cancer, semen cryopreservation, chemotherapy, male infertility, assisted reproductive techniques

### Strukturovaný souhrn

**Cíl studie:** Analýza spermogramů onkologických pacientů, posouzení vztahu patologie spermatu s onkologickou diagnózou a přehled zkušeností s programem onkologické spermabanky.

**Typ studie:** Retrospektivní klinická studie.

**Název a sídlo pracoviště:** Gynekologicko-porodnická klinika LF MU Brno.

**Metodika:** V letech 1995–2001 bylo odesláno na zmrazení spermatu před terapií maligního nádoru chemoterapií, aktinoterapií nebo orchidectomií celkem 215 mužů ve věku od 16 do 43 let ( $25,4 \pm 5,6$ ). Hodnocení spermogramu bylo provedeno podle manuálu Světové zdravotnické organizace. Kryokonzervace spermatu s Richardsonovým médiem byla provedena na přístroji Planer Kryo 10 standardní křivkou ochlazování. Parametry spermogramu byly porovnány s kontrolním souborem 84 mužů ( $23,1 \pm 3,6$  let) přicházejících na vyšetření při náboru dárců. Statistické hodnocení bylo provedeno programem SPSS verze 9 (t-test, Levenův test, chí-kvadrát, exaktní test Monte-Carlo).

**Výsledky:** Zhoubný nádor varlete byl diagnostikován u 115 (53,5 %) pacientů, maligní onemocnění mízní a krvetvorné tkáně v 75 případech (34,9 %), z toho Hodgkinův lymfom u 35 mužů (16,3 %). Pro osteosarkom bylo léčeno 12 mužů (5,6 %), ve 13 případech (6,1 %) bylo prokázáno jiné maligní onemocnění. Normospermii podle WHO mělo pouze 6 pacientů (2,8 %). Těžká oligospermie  $< 5$  mil/ml byla prokázána u 73 mužů (33,9 %), z toho azoospermie byla prokázána v 22 případech (10,2 %), kryptozoospermie u 12 mužů (5,6 %). Astenospermie  $< 10$  % spermií s progresivním pohybem byla zjištěna u 138 pacientů (64,2 %), teratospermie  $< 10$  % ve 49 případech (22,8 %). Průměrné hodnoty koncentrace, progresivního pohybu a morfologie ve skupině onkologických pacientů byly významně nižší ( $p < 0,001$ ) než v kontrolním souboru. Těžké patologie spermogramu byly významně častější u pacientů s maligními tumory varlete. Zamrazené sperma bylo dosud využito u 4 pacientů. Ve všech případech bylo nutné použít techniku ICSI, bylo dosaženo 1 těhotenství a porod. Během 4 a více let od kryokonzervace spermatu zemřelo 16,6 % pacientů.

**Závěr:** U onkologických pacientů bylo prokázáno signifikantní zhoršení spermioqramu, nejvýraznější patologie byly přítomny u mužů s maligním tumorem varlete. Kryokonzervované spermie jsou schopny s využitím metod asistované reprodukce dosáhnout těhotenství, zmrazené sperma však využije pro léčbu neplodnosti jen malé procento pacientů. Program onkologické spermabanky vyžaduje úzkou spolupráci centra asistované reprodukce s onkologickým pracovištěm.

**Klíčová slova:** karcinom, kryokonzervace spermatu, chemoterapie, mužská neplodnost, asistovaná reprodukce

## ÚVOD

Mnohé zhoubné nádory (např. morbus Hodgkin, leukémie, seminom) postihují často mladé muže ve fertlním věku a současná léčba je schopna dosáhnout jejich vyléčení a dlouhodobé přežití. Negativním dopadem onkologické terapie je u většiny pacientů těžba porucha reprodukčních funkcí včetně tvorby spermií a následná neplodnost. Důležitým úkolem komplexní péče o tyto pacienty je proto co nejlépe zachovat naději na biologicky vlastní dítě i po úspěšném vyléčení maligní choroby. Za nejúčinnější postup je v současné době považován odběr, zmrazení a dlouhodobé uskladnění spermatu. V Centru asistované reprodukce Gynnekologicko-porodnické kliniky LF MU a FN Brno byl program zmrazení a dlouhodobého uskladnění spermatu zahájen v roce 1995. Cílem práce je analýza spermioqramů onkologických pacientů přicházejících ke kryokonzervaci spermatu, posouzení vztahu patologie spermatu s onkologickou diagnózou a rozbor sedmiletých zkušeností s provozem a využitím spermabanky mladých mužů se zhoubným nádorem.

## MATERIÁL A METODY

Od října 1995 do prosince 2001 bylo do Centra asistované reprodukce gynek.-porod. kliniky MU v Brně odesláno ke kryokonzervaci spermatu 215 mužů ve věku od 16 do 43 let ( $25,4 \pm 5,6$  roků) před terapií maligního nádoru chemoterapií, aktinoterapií nebo orchidektomií. Hodnocení spermioqramu bylo provedeno podle manuálu Světové zdravotnické organizace [19]. Jako hranice normospermie byla stanovena koncentrace  $< 50\%$ . Kryokonzervace spermatu s Richardsonovým kryoprotektivním médiem byla provedena na přístroji Planer Kryo 10 standardní křivkou ochlazování. Zmrazeny byly dávky z 1–3 odběrů. Parametry spermioqramu byly porovnány s kontrolním souborem 84 mužů ve věku od 18 do 37 let ( $23,1 \pm 3,6$  roků) přicházejících na vyšetření při náboru dárců. Statistické hodnocení bylo provedeno s využitím programu SPSS verze 9 (t-test, Levenův test, chíkvadrát, exaktní test Monte-Carlo). Použité techniky asistované reprodukce odpovídaly standartu pracoviště [18]. Diagnóza a doba úmrtí byla verifikována při zachování ochrany osobních údajů z databáze Národního onkologického registru spádové oblasti.

## VÝSLEDKY

Pro zhoubný nádor varlete bylo odesláno ke kryokonzervaci spermatu celkem 115 pacientů (53,5 %). Maligní onemocnění mizní a krvetvorné tkáně bylo diagnostikováno v 75 případech (34,9 %), nejčastěji Hodgkinův lymfom (35 mužů, 16,3 %) a leukémie (25 mužů, 11,6 %). Pro osteosarkom bylo léčeno 12 mužů (5,6 %), ve 13 případech (6,1 %) bylo prokázáno jiné maligní onemocnění – gastrointestinálního traktu, močového měchýře, prostaty, respiračního traktu, kůže (tab. 1).

**Tab. 1.** Přehled onkologických diagnóz a počtu pacientů (n = 215)

Onkologická diagnóza	Počet pacientů	%
Tumor varlete	115	53,5
Lymfom Hodgkin	35	16,3
Leukémie	25	11,6
Lymfom non-Hodgkin	15	6,9
Osteosarkom	12	5,6
Ostatní	13	6,1
Celkem	215	100

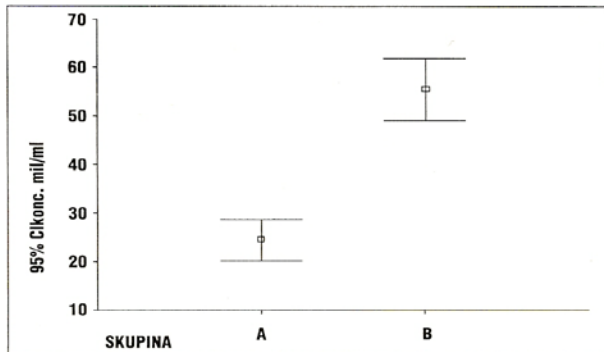
Normospermii podle WHO mělo pouze 6 pacientů (2,8 %). Těžká oligospermie  $< 5$  mil/ml byla prokázána u 73 mužů (33,9 %), z toho azoospermie byla prokázána v 22 případech (10,2 %), kryptozoospermie u 12 mužů (5,6 %). Astenospermie  $< 10\%$  spermií s progresivním pohybem byla zjištěna u 138 pacientů (64,2 %), teratospermie  $< 10\%$  ve 49 případech (22,8 %) – přehled tabulka 2.

**Tab. 2.** Výsledky spermioqramu u onkologických pacientů (n = 215)

Výsledek	Počet pacientů	%
Normospermie	6	2,8
Oligospermie $< 10$ mil/ml	105	48,8
Oligospermie $< 5$ mil/ml	73	33,9
Azoospermie	22	10,2
Kryptozoospermie	12	5,6
Astenospermie $< 25\%$	179	83,3
Astenospermie $< 10\%$	138	64,2
Teratozoospermie $< 10\%$	49	22,8

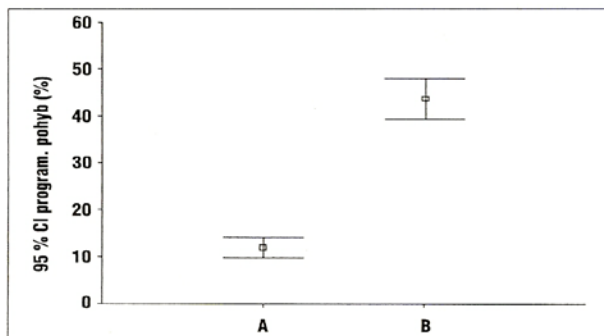
V souboru onkologických pacientů byla průměrná koncentrace spermií  $24,6 \pm 26,3$  mil/ml, progresivní pohyb  $12 \pm 13\%$ . Při porovnání s kontrolním souborem zájemců o darování spermatu





**Obr. 1a.** Průměrná koncentrace 24,6 ± 26,3 mil/ml spermií u onkologických pacientů (A, n = 215) a v kontrolním souboru 55,7 ± 28,4 mil/ml (B, n = 84), p < 0,001

CJ = confidence interval

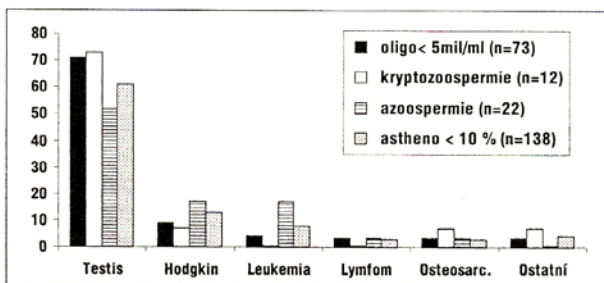


**Obr. 1b.** Průměrné hodnoty progresivního pohybu spermií 12 ± 13 % u onkologických pacientů (A, n = 215) a v kontrolním souboru 43 ± 19 % (B, n = 84), p < 0,001

CI = confidence interval

(koncentrace 55,7 ± 28,4 mil/ml, progresivní pohyb 43 ± 19 %) byly rozdíly statisticky signifikantní (p < 0,001) – obrázky 1a, 1b.

Pro hodnocení vztahu mezi onkologickou diagnózou a poruchou spermatogeneze jsme použili zastoupení těžkých patologií spermioqramu (azoospermie, kryptozoospermie, oligospermie < 5 mil/ml, astenospermie < 10 %) ve skupinách pacientů s odpovídajícím zhoubným onemocněním (obr. 2).



**Obr. 2.** Rozložení těžkých patologií spermatu (%) podle diagnóz zhoubného onemocnění (n = 215)

Pro statistickou analýzu nebyl počet pacientů v jednotlivých skupinách dostatečný, proto byly posuzovány rozdíly mezi muži se zhoubným onemocněním varlete a zbytkem souboru.

Byly prokázány tyto statisticky signifikantní rozdíly patologických hodnot spermioqramu: oligospermie < 5 mil/ml byla častěji přítomna u pacientů se zhoubným onemocněním varlete (46,1 % i 20,0 %; p = 0,006), stejně tak astenospermie < 10 % (75,7 % vs 51 %; p = 0,008), ve frekvenci ostatních patologií nebyly signifikantní rozdíly prokázány. Obdobné výsledky byly zjištěny při samostatném porovnání se skupinou pacientů se zhoubným onemocněním mízní a krvetvorné tkáně.

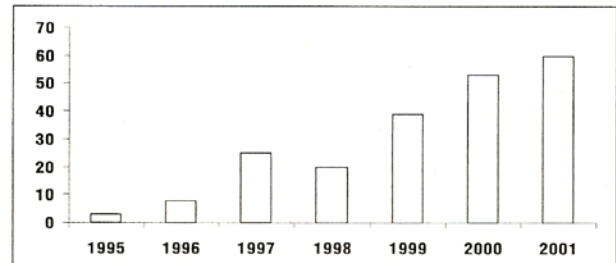
S rozvojem programu onkologické spermaban-ky a informovaností onkologických pracovišť se výrazně zvyšoval počet odeslaných pacientů. V roce 1995 přišli 3 pacienti, v roce 1997 se počet zvýšil na 27 a v roce 2001 na 61 mužů (obr. 3).

Ve spolupráci s Národním onkologickým registrem jsme zjišťovali, kolik pacientů našeho souboru během dané doby zemřelo. Z mužů, u kterých byla kryokonzervace provedena před 4 a více roky to bylo 16,6 %, při delším časovém odstupu se procento zemřelých zvyšovalo (obr. 4).

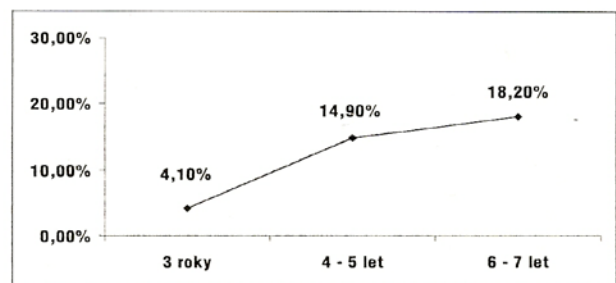
Zamrazené sperma bylo dosud využito u 4 pacientů. Ve všech případech bylo nutné použít techniku ICSI, bylo dosaženo 1 těhotenství a porod.

## DISKUSE

Frekvence diagnóz v našem souboru pacientů s převahou zhoubných nádorů varlete, mízní a k-



**Obr. 3.** Počty onkologických pacientů odeslaných ke kryokonzervaci spermatu v jednotlivých letech



**Obr. 4.** Počet pacientů (%), zemřelých v odstupu 3–7 let od kryokonzervace spermatu

vetvorné tkáně odpovídá vysoké incidenci těchto diagnóz ve fertilmím věku. Obdobné spektrum uvádí centrum Bourn Hall [10] a další pracoviště [1, 6].

Studie prokázala signifikantní snížení parametrů spermogramu u mladých mužů se zhoubným nádorem proti kontrolnímu souboru. Tyto výsledky jsou srovnatelné s údaji, které uvádí Meirrow et al. [12]. Etiologie zhoršené spermatogeneze u onkologických pacientů není přesně známa. Jako možná příčina je nejčastěji uváděn celkový stres organismu s možnou poruchou výživy [8] nebo imunologické změny [2]. Stupeň postižení spermatogeneze však nesouvisí se stupněm onkologického onemocnění [3].

Pro hodnocení závislosti zhoršení spermatogeneze na typu maligního nádoru jsme použili zastoupení nejtěžších patologií spermogramu u příslušných onkologických diagnóz. U pacientů se zhoubným nádorem varlete bylo případů azoospermie, kryptozoospermie a těžké oligoastenospermie nejvíce – rozdíl proti pacientům se zhoubným nádorem mízní a krvetvorné tkáně byl statisticky vysoce signifikantní ( $p < 0,006$ ), stejně tak oproti pacientům se všemi ostatními onkologickými diagnózami ( $p < 0,001$ ). Při analýze těchto patologií mezi jednotlivými diagnózami navzájem však žádné další signifikantní rozdíly prokázány nebyly. Nejvyšší frekvence nejtěžších patologií spermogramu u testikulárních karcinomů je plně v souladu s velmi aktuální hypotézou testikulární dysgeneze [16]. K projevům toho syndromu patří zvýšený výskyt vroze-  
ných vývojových vad genitálu (kryptorchismus, hypospadie), poruch spermatogeneze a testikulárních karcinomů. Příčinou testikulární dysgeneze je alterace vývoje varlete podmíněná faktory narušujícími endokrinní regulaci („endocrine disruptors“). Souvislost poruch spermatogeneze a karcinomu varlete potvrzuje význam důkladného urologického vyšetření u mužů s těžkými patologiemi spermogramu [17].

Některé práce [4] prokazují signifikantně horší koncentraci a pohyb spermií u mužů s Hodgkinovým lymfomem v porovnání s lymfomem non-Hodgkin, v naší studii jsme tento rozdíl neprokázali.

Po ukončení onkologické léčby dochází k obnovení spermatogeneze přibližně jen ve 20–30 % pacientů [7], k nevratné azoospermii především v případech tumoru varlete dochází až v 90 % [5]. Na výslednou funkci gonády má vliv celá řada faktorů – použité protokoly terapie [9], charakter zhoubného onemocnění, kvalita spermogramu před zahájením léčby. Nejtěžší postižení bývá v případech tumoru varlete a při použití alkylačních chemoterapeutik [13]. Obnovení spermatogeneze probíhá obvykle velmi pomalu, proto je doporučeno s hodno-

cením spermogramu vyčkat alespoň jeden rok úplné remise zhoubného nádoru. V případech azoospermie dosahují metody asistované reprodukce s chirurgickým odběrem spermií velmi špatného výsledku [4]. Kryokonzervace spermogramu před onkologickou léčbou je proto předpokladem úspěchu léčby následné neplodnosti. Základním požadavkem tohoto programu je vytvoření speciální kryobanky pro dlouhodobé skladování spermogramu. Její provoz vyžaduje přesnou databázi pacientů a vlastní dokumentaci [14]. Důležitým momentem je srozumitelné informování pacientů o možnostech a podmínkách zamrazení spermogramu a jeho použití v budoucnosti.

Zajištění tohoto úkolu vyžaduje úzkou spolupráci mezi onkologickým pracovištěm a centrem asistované reprodukce schopným tuto péči poskytnout. Ve Fakultní nemocnici Brno mezioborovou spolupráci se zúčastněnými onkologickými pracovišti a vzájemnou informovanost usnadňuje Univerzitní onkologické centrum. Dobrá informovanost onkologů o možnostech a snadné dostupnosti kryokonzervace spermogramu v našem centru vedla ke zvýšení počtu odesílajících onkologických pracovišť a k výraznému nárůstu odeslaných pacientů.

V našem souboru pacientů se zhoubným nádorem se k léčbě neplodnosti dostavilo zatím jen velmi málo mužů. Tato skutečnost odpovídá literárním údajům, např. centrum v Bourn Hall uvádí 3,6 % pacientů, u kterých bylo kryokonzervované sperma využito pro léčbu neplodnosti metodou asistované reprodukce [11]. Příčiny jsou nejen v oblasti vlastního zdravotního stavu, ale také v oblasti sociální – založení rodiny pacienti plánují mnohdy až s dlouhým časovým odstupem od úspěšného ukončení léčby. Důležitou otázkou jsou také obavy ze zvýšeného rizika vroze-  
ných vad a zhoubných onemocnění u potomstva. Byla provedena řada podrobných studií, které toto riziko sledovaly a neprokázaly jeho zvýšení [15].

## ZÁVĚR

Kryokonzervace spermogramu před onkologickou léčbou je předpokladem úspěchu léčby následné neplodnosti. Při kryokonzervaci spermogramu v těchto případech je nutné počítat se špatnou kvalitou spermogramu před i po zmrazení, mnohaletým skladováním a nutností využití intracytoplazmatické injekce spermií. Kryokonzervace spermogramu by však měla být nabídnuta každému pacientovi před terapií vedoucí k destrukci spermatogeneze.

## LITERATURA

1. Agarwal, A., Shekarriz, M., Sidhu, R. K., Thomas, A. J.: Value of clinical diagnosis in predicting the quality of cryopreserved sperm from cancer patients. *J. Urol.*, 155, 1996, s. 934–938.
2. Barr, R. D., Clark, D. A., Booth, J. D.: Dyspermia in men with localized Hodgkin disease. A potentially reversible, immune – mediate disorder. *Med. Hypoth.*, 40, 1993, s. 165–168.



3. Botchan, A., Hauser, R., Yogev L. et al.: Testicular cancer and spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 12, 1997 a, s. 755–758.
4. Botchan, A., Hauser, R., Yogev L. et al.: Sperm quality in Hodgkin's disease versus non – Hodgkin's lymphoma. *Hum Reprod.*, 12, 1997 b, s. 73–76.
5. Fossa, S. D., Theodorsen, L., Norman, N., Aabyholm, T.: Recovery of impaired pretreatment spermatogenesis in testicular cancer. *Fertil. Steril.*, 54, 1990, s. 493–496.
6. Hallak, J., Kolettis, P. N., Sekhon, V. S.: Sperm cryopreservation in patients with testicular cancer. *Urology*, 54, 1999, s. 894–899.
7. Hartmann, J. T., Albrecht, C., Schmoll, H. J.: Long-term effects on sexual function and fertility treatment of testicular cancer. *Br. J. Cancer*, 80, 1999, s. 801–807.
8. Hrubá, D., Fiala, J., Brázdová, Z. et al.: Vliv vitaminové a minerálové suplementace na kvalitu lidského spermatu. *Hygiena*, 42, 1997c, s. 123–138.
9. Chovanec, J., Šik, S., Unzeitig, V.: Toxicita chemoterapie karcinomu prsu ve spektru změn menstruačního cyklu. *Ces. Gynec.*, 65, 2000, s. 48–52.
10. Lass, A., Akagbosu, F., Abusheika, N.: A program of semen cryopreservation for patients with malignan disease: lessons from eight years experience. *Human. Reprod.*, 11, 1998, s. 3256–3261.
11. Lass, A., Burnley, A., Brinsden, P.: Sperm cryopreservation for cancer patients. *Fertil. Steril.*, 58, 2000, s. 418.
12. Meirow, D., Schenker, J. C.: Cancer and male infertility. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 2017–2022.
13. Naysmith, T. E., Blake, D. A., Harvey, V. J., Johnson, N. P.: Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? *Hum. Reprod.*, 13, 1998, s. 3250–3255.
14. Řežábek, K.: Kryokonzervace spermií a embryí. *Postgraduální medicína*, 2, 2000, s. 498–502.
15. Sankila, R., Jorgen, H. O., Anderson, A.: Risk of cancer among offspring of childhood-cancer survivors. *New Engl. J. Med.*, 338, 1998, s. 1339–1344.
16. Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K. M.: Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.*, 16, 2001, s. 972–978.
17. Turjanica, M., Pacík, D.: Může andrologické vyšetření zachránit pacientovi život? *Asistovaná reprodukce*, 11, 2001, s. 27.
18. Ventruba, P., Žáková, J., Crha, I., Němcová, S.: Intracytoplasmatická injekce spermie do oocyty a asitovaný hatching – mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. *Prakt. Gynec.*, 1, 1997, s. 14–25.
19. World Health Organisation (1992): *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. 3<sup>rd</sup> Edition. Cambridge University Press, Cambridge. s. 93.

MUDr. Igor Crha  
Gynek.-porod. klinika FN Brno  
Obilní trh 11  
656 77 Brno

## Homocysteinémie a ovariectomie – první zkušenosti s funkčním monitorováním

## Homocysteinaemia and Ovariectomy: the First Experience with Functional Monitoring

Čes. Gynec.  
67, 2002, č. 6  
s. 328 - 332

Kaprál A.<sup>1</sup>, Hyánek J.<sup>2</sup>, Živný J.<sup>1</sup>, Pejznochová H., Dubská L., Fait T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN Praha, přednosta prof. MUDr. J. Živný, DrSc.

<sup>2</sup>Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce, vedoucí prof. MUDr. J. Hyánek, DrSc.

### Structured Abstract

**Objective:** Metabolic study on plasmatic levels of homocysteine (Hcy) in 30 women post ovariectomy suffering from benign diseases.

Based on previous pilot study by 6 women patients after ovariectomy the Hcy level increase has been supposed. Further objective was to detect possible change of homocysteinemia after application of estrogen replacement therapy (ERT). Hyperhomocysteinemia (HHC) – increased level of free amino acid homocysteine in blood – is considered on lipids independent risk factor in early development of cardiovascular diseases. The deficiency of 5,10-methyltetrahydrofolate reductase (mutation C677T) is suspected as the main reason for decreased remethylation of Hcy. The group of women heterozygous for MTHFR mutation was compared with group of women patients without this mutation during the 8 weeks – monitoring after application of folliclestimulating hormone (FSH), estradiol (E2) for folate, vitamin B12 and Hcy in plasma.

**Design:** Basic study to get our own data about HHC in population of operated women before and after ovariectomy and after ERT.

**Setting:** Department of Obstetrics and Gynaecology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague.



## **PUBLIKACE XVI**

## Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking

Igor Crha, M.D.,<sup>a</sup> Pavel Ventruba, M.D.,<sup>a</sup> Jana Zakova, M.Sc.,<sup>a</sup> Martin Huser, M.D.,<sup>a</sup> Barbara Kubesova, M.D.,<sup>b</sup> Robert Hudecek, M.D.,<sup>a</sup> and Jiri Jarkovsky, M.Sc.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, and Faculty Hospital; <sup>b</sup> Tissue Bank, Faculty Hospital; and <sup>c</sup> Institute of Biostatistics and Analyses, Brno, Czech Republic

**Objective:** To evaluate the relationship between sperm pathology and cancer diagnosis, determine the mortality rate, and evaluate the outcomes of the use of frozen sperm from the sperm bank.

**Design:** Prospective study.

**Setting:** University fertility center.

**Patient(s):** A total of 619 male patients were referred for sperm freezing before gonadotoxic therapy from 1995 to 2006.

**Intervention(s):** Semen analysis, data verification in the National Oncologic Register, assisted reproduction technologies, and statistical evaluation.

**Main Outcome Measure(s):** Cancer diagnosis and sperm pathology analysis, survival of patients, and infertility treatment success.

**Result(s):** Malignant testicular cancer was diagnosed in 43.6% of patients, and malignant neoplasms of the lymphatic and hematopoietic tissues were found in 31.7% of patients. Azoospermia or severe oligospermia ( $\leq 1$  million/mL) was detected in 9.7% and 22.6% of patients, respectively. To date, 32 patients (5.2%) sought infertility treatment. Cryopreserved semen was used in 28 couples (87.5%), and 44 intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles resulted in 13 pregnancies. In total, 74 deaths (11.9%) were reported, 61 of them (82.4%) within 30 months of the cryopreservation of their sperm.

**Conclusion(s):** A significant number of patients survived. Intrauterine insemination and ICSI with cryopreserved sperm resulted in deliveries. (Fertil Steril® 2009;91:2344–8. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Cryopreservation, semen, cancer survivors, male infertility

Damage to reproductive function is a very frequent and well documented side effect associated with the treatment of malignant tumors. The first work describing chemotherapy-induced azoospermia was published in 1948 (1). Variation in sperm quality in relation to the type of malignant tumor was also investigated (2). The increasing success of cancer treatment and determined efforts to improve the quality of life after successful treatment has turned attention to the preservation of reproductive function in young men (3, 4). The development of assisted reproduction technologies has brought about effective qualitative changes in this field (5,

6). The collection, freezing, and long-term storage of sperm is currently considered to be the most effective method.

The Assisted Reproduction Center of the Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, and the Faculty Hospital in Brno launched a program of freezing sperm for long-term storage in 1995. The main aim of the present paper was to analyze the sperm counts of cancer patients, examine possible correlation between sperm pathology and cancer diagnosis, determine the mortality rate, and provide an overview of the use of the frozen sperm during the twelve years of sperm banking.

Received November 6, 2007; revised and accepted March 20, 2008; published online June 12, 2008.

I.C. has nothing to disclose. P.V. has nothing to disclose. J.Z. has nothing to disclose. M.H. has nothing to disclose. B.K. has nothing to disclose. R.H. has nothing to disclose. J.J. has nothing to disclose.

Supported by the Internal Grant Agency (IGA) of the Ministry of Health of the Czech Republic no. NR/8469-3 and IGA FN Brno Grant 10/05.

Reprint requests: Igor Crha, M.D., Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Obilni trh 11, 602 00 Brno, Czech Republic (FAX: +420 541 213 225; E-mail: icrha@seznam.cz).

### MATERIALS AND METHODS

Between October 1995 and the end of December 2006, a total of 619 male adolescents and adults aged 13 to 64 years (mean  $26.2 \pm 6.8$  years, median 26 years) were referred to the Assisted Reproduction Center for sperm cryopreservation before treatment for malignant tumours using chemotherapy, actinotherapy, or orchidectomy. Sperm



counts were evaluated according to the World Health Organization laboratory manual using the Neubauer counting chamber (7).

Commercial media, including Medi-Cult (Jyllinge, Denmark) and Vitrolife (Kungsbacka, Sweden), were used. Semen was mixed with a cryopreservation medium and placed in 2-mL Nunclon Cryotubes (Roskilde, Denmark) and followed by freezing. Cryopreservation technology and the procedures used in the storage of frozen sperm samples were aimed at minimizing the potential risks, including mistaken identity and transmission of infection. Sperm samples were frozen in the programmable Planer Kryo F10 (Sunnbury-On-Thames, U.K.) instrument using a standard cooling curve or in nitrogen vapor (used only in the absence of the instrument). Samples from 1–3 collections before starting cancer treatment were frozen. The cryotubes were stored in liquid nitrogen at a temperature of  $-196^{\circ}\text{C}$  in an LS 4800 container (Tailor-Wharton Harsco, Husum, Germany) with an indicator of the surface level and an alarm.

The assisted reproduction methods used comply with the respective standards of the department. Diagnosis and the time of death were verified with the database of the National Oncologic Register of the serving area, in compliance with personal data protection.

The study group was described using basic descriptive statistics, where categoric variables were characterized using the percentage representations of individual categories and continuous variables (age, sperm concentration and motility) were described using the mean, the median, standard deviation, and the range of values.

Statistical testing was used to confirm the hypothesis of whether or not the results of sperm counts correlate with the patient's diagnosis. The differences among a group of patients were tested using the Kruskal-Wallis test. When the influence of the diagnosis on the sperm count was significant,

partial hypotheses were tested to see which particular diagnoses differ by their values (i.e., multiple comparisons of mean ranks). The critical limit for the level of significance was set to  $P=.05$ .

The project of fertility protection in male cancer patients was approved by the Brno Faculty Hospital scientific council and ethics commission.

## RESULTS

Malignant testicular tumor (a total of 270 patients, 43.6%) was the most common diagnosis in patients who were referred for sperm cryopreservation, followed by patients with Hodgkin lymphoma (103 patients, 16.6%), leukemia (50 patients, 8.1%), or non-Hodgkin lymphoma (44 patients, 7.1%). Forty-one men were treated for malignant tumors of bone and cartilage (6.6%). Other malignant diseases occurred only sporadically.

A concentration of spermatozoa  $<20$  million/mL was found in 53.1% of patients, and 22.6% showed a concentration  $\leq 1$  million/mL. The lowest mean values of sperm count were found in men with malignant testicular tumors ( $17.2 \pm 21.4$  million/mL, median 8.0 million/mL), as shown in Table 1. Azoospermia was found in 60 men (9.7%), with the highest incidence in leukemia patients (24.0%). Progressive sperm motility  $\geq 40\%$  was found in only 4.4%, asthenospermia  $\leq 10\%$  in 64.6%, and sperm motility  $<1\%$  in 6.8% of cases. The lowest mean percentage of progressive motility was also seen in patients with malignant testicular tumours, namely  $9.8 \pm 11.3\%$ , median 5.0%.

A statistically significant correlation was found between the concentration of spermatozoa and the diagnosis (Kruskal-Wallis test:  $P<.001$ ). Detailed analysis revealed a difference between testicular tumors and malignant tumors of the digestive tract ( $P=.012$ ) and Hodgkin disease ( $P=0.003$ ). No statistically significant correlation was confirmed between

**TABLE 1**  
Sperm counts ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) with type of malignancies.

Diagnosis	Mean	Median	Min.	Max.	SD
Testicular cancer	17.2	8.0	0	122	21.4
Hodgkin disease	29.9	25.8	0	100	26.3
Leukemia	32.6	23.5	0	130	35.4
Non-Hodgkin lymphoma	29.4	23.0	0	172	31.1
Bone and cartilage MT	29.5	32.0	0	86	27.2
Digestive system MT	44.1	37.5	0	110	35.4
CNS MT	44.7	33.0	0	130	46.4
Urinary system MT	25.9	14.0	1.5	82	26.0
Respiratory system MT	48.0	36.0	2	93	33.9
Unspecified cancer	28.4	22.0	0	125	26.9
Total	25.3	16.0	0.0	172	27.7

Note: CNS = central nervous system; MT = malignant tumor.

Crha. Sperm banking for cancer patients. Fertil Steril 2009.



the diagnosis and progressive sperm motility (Kruskal-Wallis analysis of variance:  $P=0.149$ ).

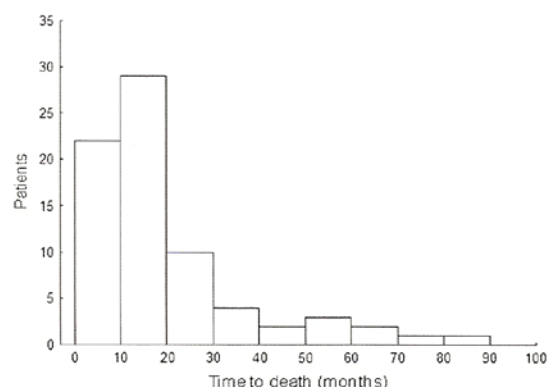
The Department of Pediatric Oncology was established in the Brno Faculty Hospital in 2000 and adolescent boys began to be referred for sperm cryopreservation to our center. In the years 2000–2006, 36 young men aged 13–16 years were referred. The most frequent diagnosis was malignant tumor of bone and cartilage (25.0%), followed by leukemia (16.7%), Hodgkin lymphoma (13.9%), and testicular tumor (11.1%). Azoospermia was detected in 8 cases (22.2%). The mean concentration of spermatozoa was 14 million/mL (median 1.8 million/mL), with mean sperm motility of 5.2% (median 2%)—significantly lower compared with the mean values for the whole group.

Of all the 619 patients referred for sperm cryopreservation, 74 (11.9%) died. The average time interval between the referral and death was  $20.5 \pm 17.3$  months, median 16 months (Fig. 1). The lowest mortality rate was found in patients with malignant testicular tumor (3.0%) and Hodgkin lymphoma (4.9%) (Table 2).

Out of the 32 men treated, 56.3% were successful in their treatment for testicular cancer, 28.1% were successful in treating Hodgkin lymphoma, and 15.6% successful in treating leukemia. The interval between cryopreservation and infertility treatment was in the range of 7–70 months (mean  $22.2 \pm 14.7$  months, median 18 months). Cryopreserved samples were used in 28 couples (nine cycles of intrauterine insemination, 38 intracytoplasmic sperm injection [ICSI] cycles), and fresh sperm was used in four cases (six ICSI cycles). Intrauterine insemination was performed for four couples (12.5%) and ICSI for 28 couples (87.5%). ICSI (44 cycles) resulted in 13 pregnancies and nine deliveries. Intrauterine insemination

**FIGURE 1**

Time interval from sperm banking to the death (in months) and number of deceased patients (n = 74).



Crha. Sperm banking for cancer patients. *Fertil Steril* 2009.

**TABLE 2**

Incidence of malignancies and number of deceased patients (n = 619).

Diagnosis	n	Deceased	%
Testicular cancer	270	8	3.0
Hodgkin disease	103	5	4.9
Leukemia	50	18	36
Non-Hodgkin lymphoma	44	7	15.9
Bone and cartilage MT	41	11	26.8
Digestive system MT	20	5	25.0
CNS MT	13	3	23.1
Urinary system MT	9	2	22.2
Respiratory system MT	7	3	42.9
Unspecified cancer	62	12	19.4
Total	619	74	12.0

Note: 100% = patients with the same diagnosis. Abbreviations as in Table 1.

Crha. Sperm banking for cancer patients. *Fertil Steril* 2009.

(nine cycles) resulted in two clinical pregnancies and two deliveries.

After the failure of two ICSI cycles, four couples (12.5% of men seeking infertility treatment after sperm cryopreservation) decided to use intrauterine insemination with donor sperm, from which seven cycles resulted in two pregnancies and deliveries.

## DISCUSSION

The frequency of certain diagnoses in this group of patients, the prevalent ones being malignant testicular tumors and tumors of lymphatic and hematopoietic tissue, corresponds to the high incidence rate of such diagnoses in men of a fertile age. Similar findings are reported by other clinics (6, 8, 9). Tumors of bone and cartilage, Hodgkin lymphoma, and leukemia were the most frequently diagnosed malignancies in young men under 16 years.

Azoospermia was found in 9.7% of males referred for sperm cryopreservation, compared with Lass et al., who reported 17.3% (10). Severe abnormalities in sperm concentration ( $\leq 5$  million/mL in 36.4%) and progressive motility ( $\leq 10\%$  in 64.6%) were frequently detected. Similarly to other studies (11, 12), the lowest concentration of spermatozoa and the lowest progressive sperm motility were found in men with malignant testicular tumors. The etiology of impaired spermatogenesis in cancer patients is not fully understood and is thought to be associated with involvement of the immune system (13). Furthermore, damage to the DNA of sperm due to the malignancy has been confirmed (14). The correlation between sperm pathology and testicular tumors is also known. The impaired quality of sperm production is most likely associated with disturbed differentiation of the testicle during the embryonic development of the gonad (15). Testicular dysgenesis

syndrome is manifested by the increased incidence of developmental defects of the genitals (cryptorchism, hypospadias), spermatogenesis disorders, and testicular carcinomas. Testicular dysgenesis is caused by alteration in the development of the testicle, determined by the factors affecting endocrine regulation ("endocrine disruptors"). Because spermatogenesis disorders correlate well with testicular carcinoma, close urologic examination of men with severe sperm abnormalities is of particular importance (16).

When analyzing impaired spermatogenesis in relation to the type of malignancy, we found a significant difference only between testicular tumors and malignant tumors of the digestive tract. Some studies have shown that the concentration of spermatozoa and sperm motility in men with Hodgkin lymphoma is significantly lower compared with patients with non-Hodgkin lymphoma (17). However, like Agarwal et al., we failed to confirm such a difference (18).

We succeeded in obtaining and freezing sperm samples from young men aged 13–16 years (77.8%), which is similar to other studies (19). Sperm samples were collected by masturbation. We did not perform electroejaculation or surgical collection. Although sperm count and sperm motility were very low, sperm cryopreservation may also be used in this age group. One of the major tasks of assisted reproduction is to preserve reproduction in patients who undergo childhood treatment for malignant tumors.

After the completion of gonadotoxic therapy, the quality of sperm was significantly impaired (20, 12). The resulting function of the gonad is affected by a number of factors, such as the diagnosis of the malignant disease, the chemotherapy regimens used, and the sperm count as determined before the start of therapy. In the case of azoospermia, the methods of assisted reproduction based on the surgical collection of sperm provide inferior results; however, recovery of spermatogenesis has also been described (21, 22). Sperm cryopreservation performed before cancer therapy is therefore a prerequisite for the successful treatment of subsequent infertility.

In the present group, only 5.2% of the men had come for infertility treatment as of the time of writing. This finding corresponds with data from other published studies (2). The reasons are not only in the area of patient health, but also in the social area, i.e., patients usually plan to start a family long after they have successfully completed therapy. Another important aspect is that patients are afraid of the increased risk of congenital defects and malignant tumors in their offspring. Many detailed studies that have investigated this risk have failed, however, to prove its increase (23, 24). Most men from the present group who came for infertility treatment were around 29 years old, had undergone successful treatment for testicular cancer or lymphoma, and usually presented 18 months after sperm cryopreservation. Intrauterine insemination was performed in our clinic much less frequently (17.0%) compared with Agarwal et al. (6); ICSI was used in 83.0% of treatment cycles.

Intrauterine insemination with donor sperm was used after failure of ICSI cycles. Couples electing to use donor sperm preferred its improved pregnancy rate, easier procedure, and decreased risk of malignant disease in the offspring.

The mortality rate of the present group of patients was analyzed also. According to the data obtained from the Oncologic Register, 11.9% of the men referred for sperm cryopreservation died; 82.4% of these died within 30 months of referral. The lowest mortality rate was found in patients with malignant testicular tumors and Hodgkin lymphomas, which corresponds to a total survival rate in patients with the early stage of testicular seminoma surpassing 95% (25).

Sperm cryopreservation before gonadotoxic therapy is the basic method used to preserve reproductive potential for the survivors of cancer treatment. It can also be used in the period of adolescence. The lowest sperm counts were found in men with malignant testicular tumors. Cancer patient sperm banking programs require close cooperation between the respective assisted reproduction centers and the cancer clinics. Sperm cryopreservation should be offered to every patient before therapy that causes the destruction of spermatogenesis.

## REFERENCES

1. Spitz S. The histologic effects of nitrogen mustard on human tumours and tissues. *Cancer* 1948;1:383–98.
2. Chung K, Irani J, Knee G, Efymow B, Blasco L, Patrizio P. Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113(Suppl 1):S7–11.
3. Tournaye H, Van Steirteghem A, Devroey P. Semen cryobanking for men with cancer. *Fertil Steril* 1993;60:197.
4. Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:12–7.
5. Palermo G, Joris H, Devroey P, Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single sperm into an oocyte. *Lancet* 1992;340:1718.
6. Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N, Pasqualotto F, Hallak J, Khayal S, et al. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked specimens. *Fertil Steril* 2004;81:342–8.
7. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1992.
8. Neal MS, Nagel K, Duckworth J, Bissessar H, Fischer MA, Portwine C, et al. Effectiveness of sperm banking in adolescents and young adults with cancer: a regional experience. *Cancer* 2007;110:1125–9.
9. Hallak J, Kolettis PN, Sekhon VS. Sperm cryopreservation in patients with testicular cancer. *Urology* 1999;54:894–9.
10. Lass A, Akagbosu F, Brinsden P. Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. *Hum Reprod Update* 2001;7:370–7.
11. Fossa SD, Theodorsen L, Norman N, Aabyholm T. Recovery of impaired pretreatment spermatogenesis in testicular cancer. *Fertil Steril* 1990;54:493–6.
12. Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;133(Suppl 1):S2–6.
13. Barr RD, Clark DA, Booth JD. Dyspermia in men with localized Hodgkin disease. A potentially reversible, immune-mediated disorder. *Med Hypoth* 1993;40:165–8.



14. Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, et al. DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin assay. *Fertil Steril* 2001;75:469-75.
15. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: opinion. *Hum Reprod* 2001;16:972-8.
16. Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, Hansen J, Olsen JH, Skakkebaek N, et al. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *Br Med J* 2000;321:781-2.
17. Botchan A, Hauser R, Yogeve L, Gamzu R, Lessing JB, Paz G, et al. Sperm quality in Hodgkin's disease versus non-Hodgkin's lymphoma. *Hum Reprod* 1997;12:73-6.
18. Agarwal A, Shekarriz M, Sidhu RK, Thomas AJ. Value of clinical diagnosis in predicting the quality of cryopreserved sperm from cancer patients. *J Urol* 1996;155:934-8.
19. Bahadur G, Ling KLE, Hart R, Ralph D, Wafa R, Ashraf A, et al. Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum Reprod* 2002;17:3157-61.
20. Meseguer M, Molina N, Garcia-Velasco JA, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. Sperm cryopreservation in oncological patient: a 14-year follow-up study. *Fertil Steril* 2006;85:640-5.
21. Chan PT, Palermo GD, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction combined with intracytoplasmic sperm injection in the treatment of men with persistent azoospermia postchemotherapy. *Cancer* 2001;15:1632-7.
22. Ragni G, Arnoldi M, Somigliano E, Paffoni A, Brambilla ME, Restelli L. Reproductive prognosis in male patients with azoospermia at the time of cancer diagnosis. *Fertil Steril* 2005;83:1674-5.
23. Meirov D, Schiff E. Appraisal of chemotherapy effects on reproductive outcome according to animal studies and clinical data. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:21-5.
24. Sankila R, Olsen JH, Anderson H, Garwicz, Glatte E, Hertz H, et al. Risk of cancer among offspring of childhood-cancer survivors. *New Engl J Med* 1998;338:1339-44.
25. Sant M, Aareleid T, Artioli ME, Berrino F, Coebergh JW, Colonna M, et al. Ten-year survival and risk of relapse for testicular cancer: EURO-CARE high resolution study. *Eur J Cancer* 2007;43:585-92.



## **PUBLIKACE XVII**

## Clinical Study

# Sperm Cryopreservation before Testicular Cancer Treatment and Its Subsequent Utilization for the Treatment of Infertility

Jana Žáková,<sup>1</sup> Eva Lousová,<sup>1</sup> Pavel Ventruba,<sup>1</sup> Igor Crha,<sup>1</sup>  
Hana Pochopová,<sup>1</sup> Jaroslava Vinklárková,<sup>2</sup> Eva Tesařová,<sup>2</sup> and Mohamed Nussir<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University and Faculty Hospital Brno, Obilní trh 11, 602 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Transfusion and Tissue Department, Faculty Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Urology, Faculty of Medicine, Masaryk University and Faculty Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jana Žáková; jzakova@fnbrno.cz

Received 20 August 2013; Accepted 7 November 2013; Published 22 January 2014

Academic Editors: E. Baldi and A. Komiya

Copyright © 2014 Jana Žáková et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Aims.** In this study we report our results with storage of cryopreserved semen intended for preservation and subsequent infertility treatment in men with testicular cancer during the last 18 years. **Methods.** Cryopreserved semen of 523 men with testicular cancer was collected between October 1995 and the end of December 2012. Semen of 34 men (6.5%) was used for fertilization of their partners. They underwent 57 treatment cycles with cryopreserved, fresh, and/or donor sperm. **Results.** A total of 557 men have decided to freeze their semen before cancer treatment. Azoospermia was diagnosed in 34 men (6.1%), and semen was cryopreserved in 532 patients. Seminoma was diagnosed in 283 men (54.1%) and nonseminomatous germ cell tumors in 240 men (45.9%). 34 patients who returned for infertility treatment underwent 46 treatment cycles with cryopreserved sperm. Totally 16 pregnancies were achieved, that is, 34.8% pregnancy rate. **Conclusion.** The testicular cancer survivors have a good chance of fathering a child by using sperm cryopreserved prior to the oncology treatment, even when it contains only limited number of spermatozoa.

## 1. Introduction

According to the data obtained from the National Oncologic Registry of ÚZIS ČR the incidence of testicular cancer is increasing worldwide. Czech Republic is on the 7th place among 182 countries of the world in the incidence 9.7 testicular cancer/100,000 males. Testicular cancer is the most common malignancy in the age group from 20 to 40 years, where the incidence in the age group between 25 and 29 years is 19.4% and from 30 to 34 years 19.6% [1]. Testicular cancer patients have a very good prognosis for survival since young patients dominate. Therefore it is important to consider the consequences of the treatment that may affect their fertility, just before initiation of cancer treatment. Germ cell tumours of an adults testis are generally classified into two main groups on the basis of histological, serological, and clinical data: (i) seminoma and (ii) nonseminoma germ cell tumours

(NSGCT), which include embryonal carcinoma, yolk sac tumours, polyembryoma, choriocarcinoma, and teratomas [2].

Fertility after the cancer treatment is variable and usually depends on the chemotherapy and radiotherapy used and/or size of the radiation field, dose, and dose intensity. Method of administration, age, and pretreatment fertility of the patient play also important role [3, 4]. The consequent measurable effects of chemotherapy or radiotherapy include compromised number of spermatozoa, their motility, morphology, and/or DNA integrity.

The basic method used to preserve reproductive potential of the survivors of cancer treatment is cryopreservation of the sperm before gonadotoxic therapy. The advances in the field of assisted reproduction techniques and sperm banking allows semen storage even in men with low sperm quality. Sperm could be used for intrauterine insemination, when

quality is fair by *in vitro* fertilization or by the Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), when concentration and/or motility is low.

Large prospective or even retrospective studies comparing the outcome of assisted reproduction with sperm from oncological patients are rare in the literature. Only a few studies analyzed the utilization of cryopreserved sperm by male cancer survivors. For instance, in retrospective review from 1992 [5] 43 out of 191 couples (22.5%) conceived after artificial insemination using husband's frozen-thawed semen and 10 out of 12 couples conceived after IVF. Also in other study IVF achieved higher success rate than insemination and ICSI was more successful than conventional IVF [6]. Large retrospective series reported on 64 patients which had received either intrauterine insemination (IUI) or conventional IVF and/or ICSI as described in 2001 [7]. In study of Magelssen et al. [8] only in 29 men out of 422, that is, 7%, their cryopreserved semen was used for ART.

Many case reports were reported with successful outcome: Hakim et al. [9] reported the achievement of pregnancies using assisted reproduction for male factor infertility after retroperitoneal lymph node dissection for testicular carcinoma. Chen et al. [10] reported pregnancy achieved using sperm administered by ICSI, from male with testicular cancer. Live birth with sperm cryopreserved and stored for 21 years prior to cancer treatment was reported in 2004 [11].

Here we report results from the Centre of Assisted Reproduction Centre at the Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University and the Faculty Hospital in Brno, which is the first Czech Centre of Assisted Reproduction, where the first Czech test tube baby was born in 1982. This Centre is also the first workplace, where the program of sperm collection, freezing, and long-term storage began in 1995 in collaboration with Urology Department Faculty Hospital in Brno, Masaryk Memorial Cancer Institute Brno, St. Anne's University Hospital Brno and Transfusion and Tissue Department of Faculty Hospital Brno.

In this report we reviewed our results with storage of cryopreserved semen for fertility preservation and subsequent infertility treatment in men with testicular cancer. We analyze the sperm counts and possible correlation between sperm pathology and cancer diagnosis and make an overview of the use of the frozen sperm for assisted reproduction during the last 18 years of sperm banking.

## 2. Materials and Methods

Young men with testicular cancer were referred (between October 1995 and the end of December 2012) from three Departments of Urology to our Assisted Reproduction Centre for sperm cryopreservation prior to the treatment of testicular cancer. All patients signed their informed consent to cryopreservation.

Specimens were produced by masturbation into a sterile container and allowed to liquify for 30 min before analysis. Semen analysis was performed according to the

WHO (World Health Organization) laboratory manual [12–14] using the Bürker or Makler counting chamber. Sperm freezing was carried out after dilution into a cryoprotectant medium Medi-Cult, respectively, Origio (Denmark), taking into account the number of spermatozoa and their motility. Semen was mixed with a cryoprotectant and divided in 1.0 mL volume cryotubes or 1.8 mL volume cryotubes Nunc (Denmark).

Cryopreservation technology and the procedures used in the storage of frozen sperm samples were aimed at minimizing the risks of potential transmission of infection. Prescreening was required and the patients were checked for Hepatitis B and C, HIV, and syphilis. Sperm samples were from 1995 to 2004 frozen in the programmable freezer Planer Kryo F10 (Sunbury-On-Thames, UK) using a standard cooling curve. From July 2004 samples were cryopreserved in nitrogen vapour only. We did not observe significant differences in motility or viability with the two methods of cryopreservation. Usually, sample collections from 1 to 3 were frozen before starting cancer treatment. The cryotubes were stored in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$  in MVE XC Dewar liquid nitrogen tank, Taylor-Wharton.

For assisted reproduction, frozen semen samples were first thawed at room temperature and allowed to recuperate for 20 min. Thawed semen samples were then washed twice with washing medium to eliminate seminal plasma. Motile spermatozoa were collected by a "swim-up" procedure. The final suspension was kept in the incubator in  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 h before insemination. Such sperm was used either for intrauterine insemination or for oocyte fertilization by classic IVF or ICSI methods.

Statistics—the study group has been described using basic descriptive statistics, where categorical variables were characterized using the percentage representations of individual categories, while continuous variables (age, sperm concentration, and motility) were described using the mean, the median, the range of values (minimum and maximum), and standard deviations. Statistical testing was used to confirm the hypothesis of whether or not the results of sperm counts correlate with the patient's diagnosis. The differences among group of patients were tested using the Kruskal-Wallis test. The critical limit for the level of significance was set to  $P = 0.05$ .

## 3. Results and Discussion

Semen of 523 men with testicular cancer was cryopreserved from 1995 to the end of 2012, that is 47% from all types of cancer patients (1111 men) (Figure 1).

557 men decided to freeze their semen before testicular cancer treatment, but azoospermia was diagnosed in 34 men (6.1%), excluding these men from the possibility to cryopreserve and subsequently use of their samples for fertility treatment. Normospermia was diagnosed only in 31 men (5.6%). Oligoasthenoteratozoospermia was diagnosed, in 296 men (53.1%) and oligozoospermia or asthenozoospermia in 296 men (35.2%). The mean age in these men was 28.5 years,  $\text{SD} \pm 6.6$ , range 13–64, median 28. Most often was semen



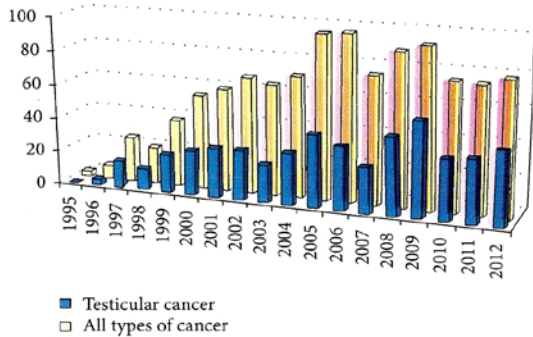


FIGURE 1: Number of men with cryopreserved semen by years.

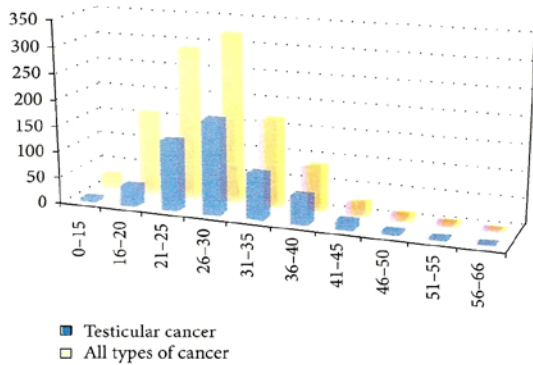


FIGURE 2: Number of men with cryopreserved semen by the age.

cryopreserved in the age from 26 to 35 years (Figure 2). Seminoma was diagnosed in 283 men (54.1%), nonseminomatous germ cell tumors (NSGCT) in 240 men (45.9%). Until now, only 14 patients (2.5%) died.

Sperm concentration was determined  $16.8 \pm 19.8$  mil/mL in seminoma group and  $19.7 \pm 19.9$  mil/mL in NSGCT, which is considered to be a nonsignificant difference. Progressive sperm motility ( $10.6 \pm 13.5\%$  in seminoma group and in NSGCT  $12.9 \pm 13.4\%$ ) was again considered to be a nonsignificant difference irrespective of tumor stage (Table 1). Statistical analysis did not reveal any significant difference of sperm count in relation to the histologic diagnosis of the cancer type.

Until now, 15 patients (2.9%) died. 34 men (6.5%) with their partners returned for infertility treatment and they underwent 57 treatment cycles: 46 with cryopreserved sperm, 3 with fresh sperm and in 8 cases after repeated unsuccessful attempt with partner's cryopreserved/thawed sperm, a donor sperm was used. These patients have been subjected to standard chemotherapy or radiotherapy treatments and they usually did not achieve natural conception.

The interval between cryopreservation and infertility treatment was in the range 7-70 months (mean  $22.2 \pm 14.7$ , median 18 months).

A small group of 6 IUI cycles resulted in 3 pregnancies (50.0% pregnancy rate) with one delivery. 38 ICSI cycles

TABLE 1: The semen analysis before cryopreservation.

	Seminoma (n = 283)	NSGCT* (n = 240)	Statistic	Totally (n = 523)
<b>Sperm concentration</b>				
Mean	16.8	19.7	NS**	18.4
Range	0-122	0-110		0-122
SD	19.8	19.9		19.9
<b>Progressive sperm motility (%)</b>				
Mean	10.6	12.9	NS**	11.8
Range	0-60	0-60		0-60
SD	13.5	13.4		13.3

\*NSGT: nonseminomatous germ cell tumors.

\*\*NS: statistically nonsignificant.

TABLE 2: Methods provided with cryopreserved/thawed sperm and fresh sperm samples.

Method	Number of cycles	Number of pregnancies	Pregnancy rate (%)	Number of deliveries
IUI	6	3	50.0	1
ICSI	38	13	34.2	5
IVF + D.O.*	2	0	0.0	0
ICSI + fresh	3	1	33.3	1
ICSI + AID**	8	0	0.0	0

\*Donor oocyte.

\*\*Donor sperm.

resulted in 13 pregnancies (34.2% pregnancy rate) with five deliveries and 2 IVF with donated eggs remained without pregnancy. At three cycles IVF + fresh sperm was obtained with 33.3% pregnancy rate with one delivery. Eight cycles with donor sperm remained without pregnancy, the deep problems manifested at female side. These results are summarised in Table 2.

Although male cancer survivors can become parents through options such as adoption or sperm donation, most prefer to have a biological offspring, even if they have concerns about birth defects that could be caused if the man had cancer before conception or anxiety about their own longevity or their child's lifetime cancer risk [15, 16]. Advances in diagnostics and management of this cancer and progress in the treatment contribute to the significant improvement in the survival rate of this very common malignancy in young men [17]. At our workplace azoospermia was found in 6.1% of males referred for sperm cryopreservation as compared to 17.3% [18] and to only 3.3% [7]. The reduction in sperm concentration and progressive motility were detected in both seminoma and NSGCT group similarly to other studies [19, 20]. Currently, the aetiology of impaired spermatogenesis in testicular cancer patients is not fully understood. Serious damage to the DNA of sperm due to the malignancy was confirmed [21]. However some other work did not report significant differences in mean sperm DNA fragmentation index within cancer subgroups or when comparing testicular and nontesticular cancers and the measured parameters in

cancer subgroups did not differ from healthy men [19]. The correlation between sperm pathology and testicular tumours is also known [22]. The impaired quality of sperm production is probably associated with disturbed differentiation of the testicle during the embryonic development of the gonad according to Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS) hypothesis [23]. TDS syndrome is manifested by the increased incidence of developmental defects of the genital (cryptorchidism, hypospadias), spermatogenesis disorders and testicular carcinomas. Testicular dysgenesis is caused by alteration in the development of the testicle, being determined by the factors affecting endocrine regulation ("endocrine disruptors"). As spermatogenesis disorders correlate well with testicular carcinoma, close urological examination of men with severe sperm abnormalities is of importance. When analysing impaired spermatogenesis in relation to the type of malignancy, we did not find a significant difference (in contrast to Agarwal et al. [24]).

After the completion of gonadotoxic therapy, the quality of sperm was significantly impaired. The effect of radiotherapy on male fertility is clearly dose dependent. The application of radiation to tests greater than 6 Gray will result in irreversible azoospermia. At levels of 3.5 Gray, sterility does occur. The loss of fertility is usually reversible although commonly such recovery will take 18 to 24 months [25]. Sperm cryopreservation performed prior to cancer therapy is therefore a prerequisite for the successful treatment of subsequent infertility. The main requirement of this programme is to establish a special cryobank to allow safe long-term storage of sperm samples. The operation of such a cryobank requires an exact database of patients and meticulous maintenance of its own records. Another important aspect is that the patients should be given clear and relevant information on the possibilities and conditions of sperm cryopreservation and its use in the future.

The fulfilment of this task requires close cooperation between the Department of Urology and Assisted Reproduction Centre capable of providing this kind of treatment. In the Faculty Hospital Brno, this interdisciplinary cooperation was effectively facilitated [26]. Thanks to a strong awareness among urology specialists and availability of sperm cryopreservation in our Centre, the number of patients referred for this procedure has quickly increased.

In our study only 6.5% of males have come for infertility treatment so far; this finding is similar to data reported in the literature, for example, 7.7% [7]. Pacey et al. reported the utilization rates of banked sperm as very low (<10%) and the majority of samples were kept for many years without being used [27]. By UK study, to date very few (4%) of their patients chosen to discard, use; or move to another centre [28].

The reasons are not only in the area of patient health, but also in the social area; that is, patients usually plan to start a family long after they have successfully completed therapy [29]. Most males from our group who came for infertility treatment had undergone successful treatment for testicular cancer and usually came 18 months after sperm cryopreservation. One study in men suggested that having banked sperm was a positive factor for coping emotionally with cancer, even if samples were never used [30]. The similar

beneficial role of psychological support plays ovarian tissue cryopreservation in young women suffering from cancer [31, 32].

Intrauterine insemination was performed in our clinic much less frequently (13.0%) and ICSI was used in 82.6% of treatment cycles. Only 2.7% males referred for sperm cryopreservation died, which corresponds to the total survival rate in patients with the early stage of testicular seminoma, which exceeds 95% [33].

#### 4. Conclusions

The testicular cancer survivors have a good chance of fathering a child by using sperm cryopreserved prior to the oncology treatment thanks to assisted reproduction methods. In the ICSI era, almost any cryopreserved semen sample, even when it contains only few sperm, could be used for subsequent infertility treatment. Semen preservation before the beginning of therapy should be proposed to all adult men and postpubertal boys. To date, no clinically proven methods are available to preserve fertility in prepubertal males. The hope is that one day science will provide a mechanism for immature germ cells from the testicular tissue of those patients to be used *in vivo* or *in vitro* to facilitate reproduction. Sperm banking program requires close cooperation between assisted reproduction centers and the cancer clinics.

#### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

#### Acknowledgment

This work was supported by Ministry of Health, Czech Republic, conceptual development of research organization (FNBr, 65269705).

#### References

- [1] L. Dušek, J. Mužík, M. Kubásek, J. Koptíková, J. Žaloudík, and R. Vyzula, *Epidemiology of Malignant Tumours in the Czech Republic [Online]*, Masaryk University, Brno, Czech Republic, 2005, <http://www.svod.cz/>.
- [2] F. K. Mostofi, *Histological Typing of Testis Tumours, International Histological Classification of Tumours*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1977.
- [3] L. Gandini, P. Sgrò, F. Lombardo et al., "Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients," *Human Reproduction*, vol. 21, no. 11, pp. 2882–2889, 2006.
- [4] U. Reš, P. Reš, D. Kastelic, M. Stanovnik, A. Kmetec, and A. Merlo, "Birth after treatment of a male with seminoma and azoospermia with cryopreserved-thawed testicular tissue," *Human Reproduction*, vol. 15, no. 4, pp. 861–864, 2000.
- [5] W. G. Sanger, J. H. Olson, and J. K. Sherman, "Semen cryobanking for men with cancer—criteria change," *Fertility and Sterility*, vol. 58, no. 5, pp. 1024–1027, 1992.



- [6] H. Tournaye, A. Van Steirteghem, P. Devroey, W. G. Sanger, J. H. Olson, and J. K. Sherman, "Semen cryobanking for men with cancer," *Fertility and Sterility*, vol. 60, no. 1, pp. 197–198, 1993.
- [7] S. Kelleher, S. M. Wishart, P. Y. Liu et al., "Long-term outcomes of elective human sperm cryostorage," *Human Reproduction*, vol. 16, no. 12, pp. 2632–2639, 2001.
- [8] H. Magelssen, T. B. Haugen, V. Von Düring, K. K. Melve, B. Sandstad, and S. D. Fosså, "Twenty years experience with semen cryopreservation in testicular cancer patients: who needs it?" *European Urology*, vol. 48, no. 5, pp. 779–785, 2005.
- [9] L. S. Hakim, S. M. Lobel, and R. D. Oates, "The achievement of pregnancies using assisted reproductive technologies for male factor infertility after retroperitoneal lymph node dissection for testicular carcinoma," *Fertility and Sterility*, vol. 64, no. 6, pp. 1141–1146, 1995.
- [10] S.-U. Chen, H.-N. Ho, H.-F. Chen, S.-C. Huang, T.-Y. Lee, and Y.-S. Yang, "Pregnancy achieved by intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved semen from a man with testicular cancer," *Human Reproduction*, vol. 11, no. 12, pp. 2645–2647, 1996.
- [11] G. Horne, A. D. Atkinson, E. H. E. Pease, J. P. Logue, D. R. Brison, and B. A. Lieberman, "Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: case report," *Human Reproduction*, vol. 19, no. 6, pp. 1448–1449, 2004.
- [12] World Health Organization, *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, Cambridge University Press, 3rd edition, 1992.
- [13] World Health Organization, *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, Cambridge University Press, 4th edition, 1999.
- [14] World Health Organization, *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, Cambridge University Press, 5th edition, 2010.
- [15] A. Rosen, "Third-party reproduction and adoption in cancer patients," *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, no. 34, pp. 91–93, 2005.
- [16] S. D. Fosså, H. Magelssen, K. Melve, A. B. Jacobsen, F. Langmark, and R. Skjaerven, "Parenthood in survivors after adulthood cancer and perinatal health in their offspring: a preliminary report," *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, no. 34, pp. 77–82, 2005.
- [17] D. A. Paduch, "Testicular cancer and male infertility," *Current Opinion in Urology*, vol. 16, no. 6, pp. 419–427, 2006.
- [18] A. Lass, F. Akagbosu, and P. Brinsden, "Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner," *Human Reproduction Update*, vol. 7, no. 4, pp. 370–377, 2001.
- [19] S. McDowel, K. Harrison, B. Kroon, E. Ford, and A. Yazdani, "Sperm DNA fragmentation in men with malignancy," *Fertility and Sterility*, vol. 99, no. 7, pp. 1862–1866, 2013.
- [20] G. Bahadur, K. L. E. Ling, R. Hart et al., "Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients," *Human Reproduction*, vol. 17, no. 12, pp. 3157–3161, 2002.
- [21] H. Kobayashi, K. Larson, R. K. Sharma et al., "DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay," *Fertility and Sterility*, vol. 75, no. 3, pp. 469–475, 2001.
- [22] R. Jacobsen, E. Bostofte, G. Engholm et al., "Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study," *British Medical Journal*, vol. 321, no. 7264, pp. 789–792, 2000.
- [23] N. E. Skakkebaek, E. Rajpert-De Meyts, and K. M. Main, "Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects," *Human Reproduction*, vol. 16, no. 5, pp. 972–978, 2001.
- [24] A. Agarwal, M. Shekariz, R. K. Sidhu, and A. J. Thomas Jr., "Value of clinical diagnosis in predicting the quality of cryopreserved sperm from cancer patients," *Journal of Urology*, vol. 155, no. 3, pp. 934–938, 1996.
- [25] N. Aass, S. D. Fossa, L. Theodorsen, and N. Norman, "Prediction of long-term gonadal toxicity after standard treatment for testicular cancer," *European Journal of Cancer*, vol. 27, no. 9, pp. 1087–1091, 1991.
- [26] J. Žáková, P. Ventruba, I. Crha, and E. Lousová, "Sperm donation programme at the centre of assisted reproduction in BRNO: results from 1995–2005," *Scripta Medica Facultatis Medicinae Universitatis Brunensis Masarykianae*, vol. 78, no. 6, pp. 323–328, 2005.
- [27] A. A. Pacey, H. Merrick, E. Arden-Close et al., "Monitoring fertility (semen analysis) by cancer survivors who banked sperm prior to cancer treatment," *Human Reproduction*, vol. 27, no. 11, pp. 3132–3139, 2012.
- [28] V. Sharma, "Sperm storage for cancer patients in the UK: a review of current practice," *Human Reproduction*, vol. 26, no. 11, pp. 2935–2943, 2011.
- [29] M. S. Neal, K. Nagel, J. Duckworth et al., "Effectiveness of sperm banking in adolescents and young adults with cancer: a regional experience," *Cancer*, vol. 110, no. 5, pp. 1125–1129, 2007.
- [30] K. Saito, K. Suzuki, A. Iwasaki, Y. Yumura, and Y. Kubota, "Sperm cryopreservation before cancer chemotherapy helps in the emotional battle against cancer," *Cancer*, vol. 104, no. 3, pp. 521–524, 2005.
- [31] J. Zakova, M. Sedlackova, S. Polak, J. Dumkova, P. Ventruba, and I. Crha, "Methods for preserving fertility in young women suffering from cancer: some aspects of ovarian tissue cryopreservation," *Bratislava Medical Journal*, vol. 113, no. 3, pp. 192–194, 2012.
- [32] M. Huser, I. Crha, R. Hudecek et al., "Ovarian tissue cryopreservation—new opportunity to preserve fertility in female cancer patients," *European Journal of Gynaecological Oncology*, vol. 28, no. 4, pp. 249–256, 2007.
- [33] M. Sant, T. Aareleid, M. E. Artioli et al., "Ten-year survival and risk of relapse for testicular cancer: a EUROCARE high resolution study," *European Journal of Cancer*, vol. 43, no. 3, pp. 585–592, 2007.



## **PUBLIKACE XVIII**

8. Mára, M., Fučková, Z., Mašata, M., et al. Management děložních myomů u žen ve fertilním věku. *Čes. Gynek.*, 2003, 68, s. 30-36.
9. Nezhat, C., Nezhat, F., Luciano, A., et al. *Operative Gynecologic Laparoscopy: Principles and Techniques*. New York: McGraw-Hill Inc. 1995.
10. Novotný, Z. Komplikace laparoskopie. In Holub Z., Kužel D. et al. *Minimálně invazivní operace v gynekologii*. Praha: Grada Publishing s.r.o., 2006.
11. Peršín, J., Hanousek I. Výsledky konzervativní chirurgické léčby děložních myom: pětiletá studie. *Čes. Gynek.*, 2006, 71, s. 322-325.
12. Stringer, N.H., Walker, J.C., Meyer, P.N. Comparison of 49 laparoscopic myomectomies with 49 open myomectomies. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.*, 1997, 4, p. 457-464.

13. Takeuchi, H., Kinoshita, K. Evaluation of adhesion formation after laparoscopic myomectomy by systematic second-look microlaparoscopy. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.*, 9, 2002, p. 442-446.

Doc. MUDr. Zdeněk Holub, CSc.  
Gynekologicko-porodnické oddělení  
Oblastní nemocnice Kladno u.s.  
Vančurova 1548  
272 58 Kladno  
endogyn@seznam.cz

## Kryokonzervace ovariální tkáně – šance na záchranu fertility žen s nádorovým onemocněním

Čes. Gynek.  
72, 2007, č. 1  
s. 68-73

### Ovarian Tissue Cryopreservation

Huser M.<sup>1</sup>, Juránková E.<sup>1</sup>, Crha I.<sup>1</sup>, Ventruba P.<sup>1</sup>, Hudeček R.<sup>1</sup>, Žáková J.<sup>1</sup>, Šmardová L.<sup>2</sup>, Král Z.<sup>2</sup>  
1 Centrum asistované reprodukce CAR 01, Gynekologicko - porodnická klinika Fakultní nemocnice, Brno  
2 Interní hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice, Brno

#### Summary

Chemotherapy is one of the basic modalities of oncological therapy and usually leads to permanent consequences. Infertility is one of the most common consequences resulting from irreversible gonadal damage. The potentially effective method of reproductive function protection in women undergoing chemotherapy is ovarian tissue cryopreservation. This paper summarizes the medical and scientific knowledge in this interesting multidisciplinary medical field and also presents authors own experience with this novel and interesting method of ovarian tissue protection.

**Key words:** cancer, infertility, assisted reproduction, ovarian tissue cryopreservation

#### Souhrn

Chemoterapie jako jedna ze základních modalit onkologické léčby zanechává často trvalé následky a mezi nejčastější patří právě neplodnost na základě ireverzibilního poškození gonád. Jednou z metod zachování fertility u žen s nádorovým onemocněním je kryokonzervace ovariální tkáně (KOT). Jedná se o metodu intenzivně rozvíjenou v posledních několika letech. Článek podává souhrnný přehled nejnovějších poznatků o této problematice a prezentuje také vlastní zkušenosti touto metodou u pacientek s nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním krvetvorby.

**Klíčová slova:** nádorové onemocnění, neplodnost, asistovaná reprodukce, kryokonzervace ovariální tkáně

## ÚVOD

Nádorová onemocnění patří hned po kardiovaskulárních chorobách mezi nejčastější příčiny smrti v reprodukčním věku žen i mužů a to i přes obrovský rozmach diagnostiky a léčby v onkologii. Podle údajů American Cancer Society v USA onemocní ročně rakovinou 600 tisíc žen, z toho 60 000 (10 %) je v reprodukčním věku [1]. V České republice je situace obdobná, podle údajů Národního onkologického registru (NOR) v roce 2003 onemocnělo rakovinou 58 000 žen v reprodukčním věku [2]. S rozvojem nových diagnostických metod dochází k zachytu nádorového bujení ve stále časnějším stadiích a s použitím moderních metod chemoterapie

a radioterapie přibývá pacientů, které se podaří trvale vyléčit či dosáhnout u nich dlouhodobě remise onemocnění.

Podle odhadů amerického National Cancer Institute (NCI) bude mít v roce 2010 každý 250. dospělý člověk v anamnéze úspěšnou léčbu zhoubného nádoru [3]. Chemoterapie jako jedna ze základních modalit onkologické léčby zanechává často trvalé následky a mezi nejčastější patří právě neplodnost na základě ireverzibilního poškození gonád [4]. Moderní metody ÁR mohou dnes nabídnout vyléčeným onkologickým pacientkám šanci na vlastní rodinu, ale v posledních letech jsou usilovně vyvíjeny i postupy k prevenci neplodnosti již v průběhu onkologické léčby.

## CHEMOTERAPIE A NEPLODNOST

Mechanismus účinku chemoterapie na ovaria není dosud zcela objasněn. Většina teorií předpokládá toxické působení na buňky membrana granulosa nebo oocyty vedoucí ke konečné atrezii folikulu. Cytostatika zasahují do buněčného cyklu převážně rychle se množících buněk, a působí tedy i na buňky membrana granulosa, jejichž dělení probíhá pod kontrolou hypofyzárních gonadotropinů. Některé nepřímé důkazy naznačují, že právě gonadotropní stimulace je předpokladem pro účinek chemoterapeutika na ovarium. Podávání alkylačních substancí vede k rychlému zániku již zralých folikulů, následnému nástupu dozrávání ještě nezralých folikulů a urychlení deplece počtu primordiálních folikulů [5].

Gonadotoxický účinek cytostatik je rozdílný, mezi nejsilnější působící látky patří alkylační cytostatika, naopak metotrexát nebo 5-fluoruracil vykazují minimální nežádoucí vliv na folikulární aparát ovarií nebo spermatogenezi. Klinicky se poškození ovarií u ženy v reprodukčním věku projevuje jako sekundární amenorea nebo oligomenorea, která se po ukončení léčby může spontánně upravit. U některých žen zvláště po 30. roku života dochází k trvalé amenoree a rozvoji předčasného ovariálního selhání s hormonálním obrazem hypergonadotropního hypogonadismu [6].

Riziko rozvoje předčasného ovariálního selhání u žen po chemoterapii závisí zejména na věku pacientky, typu použitého gonadotoxického agens, použitém léčebném režimu a celkové kumulativní dávce. Přehled gonadotoxických chemoterapeutik je uveden v tabulce 1. Kumulativní gonadotoxické dávky vybraných chemoterapeutik prezentuje tabulka 2.

## METODY PREVENCE POŠKOZENÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK

Rutině používanou metodou, která vede k záchraně fertility u mužů, je kryokonzervace spermatu před onkologickou léčbou, která má na našem pracovišti dlouholetou tradici [7]. Tento postup je hojně využíván lékaři většiny klinických oborů, což svědčí o jeho širokém povědomí mezi odbornou i laickou veřejností. Obdobnou analogii výše popsané metody u žen se jeví kryokonzervace oocytů. Jedná se o metodu intenzivně rozvíjenou zejména v posledním desetiletí, nicméně jejímu rutinní rozšíření do běžné praxe zatím brání poměrně malá úspěšnost při dosažení fertility z kryokonzervovaných oocytů [8]. Intenzivně jsou nyní zkoumány technické postupy při kryokonzervaci a rozmrazování, které by byly schopny předejít poškození obalu oocyty (zona pelucida hardening) a sítě mikrotubulů (meitoe spindle), která je nezbytná k dokončení meiozy maturovaného oocyty [9].

Další klinicky používaný postup, který může vést k záchraně fertility před zahájením onkologické léčby, je provedení IVF cyklu s oplazením a následně kryokon-

Tab. 1. Přehled gonadotoxických cytostatik

Alkylační látky	Cyclophosphamid Chlorambucil Melphalan Busulphan Carmustine (BCNU) Lumustin (CCNU) Methoxamin
Antimetabolity - platinové deriváty, Vince alkaloidy, Taxany	Cis-platina, carbo-platina Vinblastin, Viceristin Paclitaxel Docetaxel Cytosin arabinosid Procarbuzin

Tab. 2. Kumulativní dávky cytostatik vyvolávající trvalou azoospermii u více než 50 % pacientů (upraveno podle Schröder M. et al. Oncology [32])

Cyclophosphamid	7,5 g/m <sup>2</sup>
Procarbuzin	2,5 g/m <sup>2</sup>
Chlorambucil	1,3 g/m <sup>2</sup>
Vinkristin	1,0 g/m <sup>2</sup>
Paclitaxel	1,3 g/m <sup>2</sup>
Chlorambucil	4,0 g/m <sup>2</sup>
Procarbuzin	2,5 g/m <sup>2</sup>

zervace embryí po jejich kultivaci v podmínkách in vitro [10]. Tato metoda je technicky již dobře zvládnuta a zavedena do běžné praxe, nicméně její využití je limitováno několika závažnými podmínkami. Nejvíce limitujícím požadavkem je poměrně časně stadium onkologického procesu a s tím související dobrý zdravotní stav pacientky, který dovolí odsunout zahájení onkologické léčby asi o 3-4 týdny a podstoupit ovariální stimulaci s následným odběrem oocytů. Dalším převážně legislativně-etickým omezením je existence partnera pacientky a jeho písemný souhlas s provedením IVF cyklu a poskytnutí jeho spermií k oplazení získaných oocytů.

Analogií kryokonzervace spermatu, oocytů či embryí se jeví kryokonzervace ovariální tkáně (KOT). Jedná se o metodu intenzivně rozvíjenou v posledních několika letech. Významnou výhodou této metody je její rychlá proveditelnost v době klinického stagingu nádorového onemocnění bez nutnosti odsunutí zahájení protinádorové léčby. Dalším nesporným benefitem je také fakt, že pacient nemusí podstupovat hormonální léčbu, která může ovlivnit biologické chování některých typů maligních buněk.

Všechny výše popsané metody vycházejí z rozvíjených metod AR a využívají zkušeností s kryokonzervací lidských gamet či embryí. Základní vlastností gamet je jejich rozsáhlý germinální potenciál, a tudíž jsou předurčeny jako jedny z prvních obětí agresivní chemoterapie. Proces folikulogeneze a maturace oocyty je řízen zejména hormonálně. Mezi klinicky používané léky, které dokážou tyto procesy ovlivnit, patří mimo jiné analoga gonadoliberinu (GnRH-a). Na základě některých pilotních studií bylo prokázáno, že pomocí těchto léků je možné oocyty zastavit ve vývoji na úrovni primordiálních-



ních folikulů (podobně jako je tomu v prepubertálním období vývoje ženy) a takto inhibované oocyty pak vykazují výrazně nižší senzitivitu na chemoterapii [11]. Ověření protektivního účinku analog GnRH na ovariální tkáň je předmětem zkoumání prospektivní kohortové studie u pacientek s Hodgkinovým lymfomem probíhající nyní na našem pracovišti.

V roce 2004 publikované narození prvního zdravého dítěte po ortotopické autotransplanci ovariální tkáně [12] ukazuje klinickou využitelnost tohoto postupu a šanci na vlastní dítě pro mladou ženu s diagnostikovaným zhoubným nádorem. V následujícím textu uvádíme přehled poznatků a dosažených úspěchů v této zajímavé multidisciplinární oblasti.

## INDIKACE KE KRYOKONZERVACI OVARIÁLNÍ TKÁNĚ

Pro pacienty s nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním, kteří potřebují co nejrychleji zahájit chemoterapii, je kryokonzervace ovariální tkáně alternativou prevence ovariálního poškození či selhání [13, 14]. Cílem celého procesu je nabídnout pacientce bez známek recidivy základního onemocnění po ukončení protinádorové léčby možnost reimplantace takto zachované ovariální tkáně do malé pánve či na jiné místo lidského těla (heterotopická autotransplantace).

Navíc tato metoda může být použita také u řady benigních systémových onemocnění vyžadujících cytotoxickou chemoterapii (systémový lupus a některá jiná, zejména imunologická onemocnění). Dále je možné tuto metodu využít u některých nemocí ovaria, jako jsou recidivující ovariální cysty či rozsáhlá pánevní endometrióza [15, 16].

## PROCES KRYOKONZERVACE OVARIÁLNÍ TKÁNĚ

V posledních 10 letech se tomuto tématu věnovala celá řada experimentálních studií. V roce 1996 pilotní studie Hovatta a Newtona vyzkoušela kryokonzervační postupy s využitím různých kryoaprotectantů a potvrdila, že ovariální tkáň je odolná k procesu hlubokého zamražení [17, 18]. Později Newton a zejména Gook zjistili, že právě primordiální folikuly jsou nejvíce odolné vůči celému procesu zamražení i rozmražení a bylo dosaženo vzniku maturovaných MII oocytů, které pocházely ze zamražené a následně rozmražené ovariální tkáně implantované imunodeficientním myším [19, 20].

Doposud byla ovariální tkáň úspěšně zamražena a následně transplantována kromě myší také u ovce, králíka a kosmana [21, 22, 23]. Tyto studie ukazují jasnou korelaci mezi poškozením tkáně a délkou trvání ischemie při odběru a zpracování tkáně. Pokles počtu primordiálních folikulů v důsledku hypoxie je odhadován na 50-65 %. Podle některých studií jsou buňky ovariální tkáně

schopny tolerovat ischemii minimálně po dobu 3 hodin.

V současnosti jsou zkoumány možnosti využití látek, zejména antioxidantů (kyselina askorbová) či vascular endothelial growth factor - VEGF, které by dokázaly snížit procento buněk poškozených kryokonzervací [24].

Tyto úspěchy vedly k vypracování kryokonzervačních postupů a protokolů také v humánní medicíně. V současné době jsou využívány dva základní typy kryokonzervačních protokolů podle typu použitého kryoaprotectantu. Jejich výhody a limity jsou shrnuty v tabulce 3. K hodnocení úspěšnosti kryokonzervačních postupů jsou využívány metody histologického vyšetření tkáně, zejména procento přežívání primordiálních folikulů a procento fibrotizace ve štěpu po transplantaci.

V roce 2004 byl popsán první případ, kdy došlo po autotransplanci zamraženého vzorku ovariální tkáně k vytvoření euploidního embrya [25] a vzápětí k porodu dítěte po ortotopické transplantaci u pacientky dříve léčené pro lymfom [12, 26]. V případě posledně jmenované práce byla ovariální tkáň transplantována ortotopicky, tedy do místa vedle původního ovaria, které bylo zničeno chemoterapií. U pacientky byla sporadicky pozorována ovulace, a proto je teoreticky možné, že gravidita mohla vzniknout z oocytu vzniklého v původním ovariu ponechaném in situ a nikoli ve transplantované ovariální tkáni. Na jaře 2005 byla publikována práce izraelských autorů, kdy bylo dosaženo gravidity a porodu zdravého dítěte po ortotopické autotransplanci ovariální tkáně a následném IVF cyklu u 28leté ženy tři roky po ukončení chemoterapie pro non-hodgkinský lymfom [27].

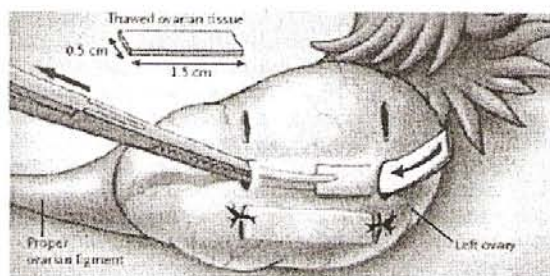
Celý proces kryokonzervace ovariální tkáně (KOT) je komplexnější než kryokonzervace embrya či oocytu. Vyžaduje uchování více typů buněk, a je tedy více podobný kryokonzervaci jiných orgánů a tkání (ledviny, játra apod.) v transplantologii při porovnání s rutinním zamrazováním gamet. Více než 90 % buněk ovariálního kortexu tvoří primordiální folikuly obklopené vrstvou granulózových buněk a vazivové tkáně. Většina folikulů je umístěna v oblasti do 1 mm pod kortikálním epitélem ovaria, a tedy pro možnou transplantaci a zachování růstového potenciálu folikulů se předpokládá nutnost zachovat také integritu těchto doprovodných struktur ovariální tkáně.

### Odběr tkáně a její zpracování

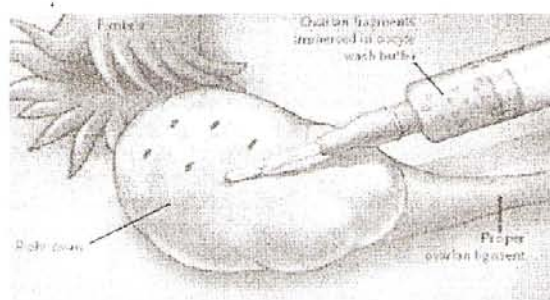
Odběr tkáně je nejvýhodnější provést laparoskopicky v krátkodobé celkové anestezii. Vzhledem k lokalizaci primordiálních folikulů v ovariu je nutné odebrat několik plátků ovariálního kortexu v tloušťce 1-3 mm. Otázkou zůstává celkový objem odebrané tkáně a rozsah resekce. V literatuře je popsáno několik postupů od odběru celého ovaria, jeho části či pouze malých vzorků tkáně biopstickými kleštěmi. Neoptimálnější z hlediska dalšího zpracování se jeví odběr 2-3 plátků tkáně z obou ovaríí, který je před kryokonzervací zpracován na menší kousky („cortical strips“) o velikosti asi 10 x 3 x 2 mm.

Zásadním limitujícím faktorem pro přežití folikulů v odebraném vzorku je délka ischemie. Při pokusech





Obr. 1. Ortotropická transplantace ovariálních proužků (převzato z Meirao D. et al. N Eng J Med 245 (2005): 954-58)<sup>27</sup>



Obr. 2. Ortotropická transplantace suspenze ovariální tkáně (převzato z Meirao D. et al. N Eng J Med 245 (2005): 954-58)<sup>27</sup>

o minimalizaci ischemického poškození byly na animálních modelech provedeny pokusy o perfuzi celého ovaria kryoprotektanty a jeho následné zamrazení jako celku [28]. Na základě pozorování autorů byly ale výsledky v přežívání folikulů po zamrazení celého ovaria srovnatelné s metodou zamrazení kortikálních proužků.

#### Autotransplantace ovariální tkáně

Techniky autotransplantace ovariální tkáně u člověka lze rozdělit na ortotropické a heterotropické. Ortotropická transplantace znamená uložení štěpu do malé pánve do ovarické fossy či přímo do hormonálně inaktivního ovaria. Vzorok je možné uložit do peritoneální duplikatury a fixovat stehem či přímo do ovaria pomocí různých technik [12]. Perspektivní se zdá uložení ovariálních proužků přímo do ovariálního kortexu a fixace stehem (obr. 1) či mnohočetná injekce suspenze malých kousků ovariální tkáně přímo do ovariálního kortexu (obr. 2) [27].

Některými autory bylo prokázáno, že peritoneální tkáň se lépe hodí k transplantaci než jiné oblasti (podkoží, svalová tkáň), protože zde došlo k menší ztrátě v počtu primordiálních folikulů [29]. Nevýhodou ortotropické transplantace je větší invazivita výkonu, někdy i s nutností laparotomie. Nicméně laparoskopický přístup vzhledem k vyspělosti této operační techniky převažuje.

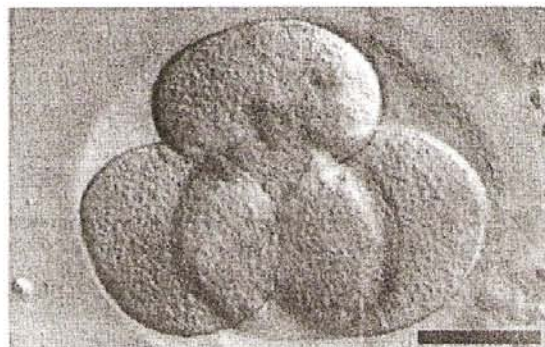
Další možností je heterotropická transplantace štěpu do

podkoží, kdy se jedná o výkon daleko méně invazivní většinou bez nutnosti celkové anestezie. Jsou popsány transplantční techniky do podkoží předloktí a podbřišku. Studie na primátech potvrdily schopnost ovariálního štěpu vytvořit zralý oocyt i v cizím prostředí podkožní tkáně mimo malou pánev. V oblasti humánní medicíny bylo dosaženo vytvoření diploidního embrya v autotransplantátu (obr. 3), zatím bez dosažení gravidity po embryotransferu [25].

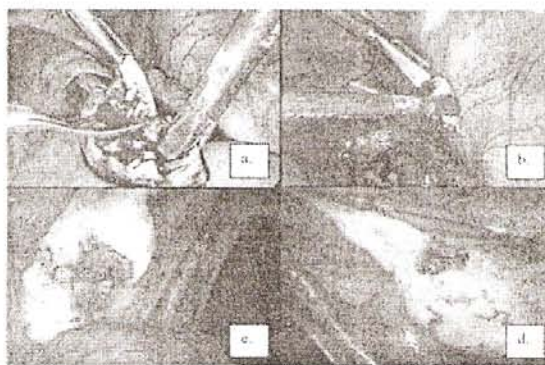
#### Sledování a další využití autotransplantátu

Klinickým důkazem funkce transplantátu je obnovení menstruačního cyklu u pacientky s iatrogení amenoreou po chemoterapii (hypergonadotropní hypogonadismus). Podle dosud publikovaných prací došlo ke spontánnímu nástupu menstruace v intervalu 6-12 měsíců po transplantaci.

Nejjednodušší možností sledování funkce transplantovaného ovariálního štěpu je sledování hladin ovariálních



Obr. 3. Euploidní čtyřbuněčné lidské embryo vzniklé po heterotropické transplantaci ve štěpu ovariální tkáně v podkoží paže (Převzato z Oktay K. et al. Lancet 363 (2004):837-840)<sup>25</sup>



Obr. 4. Laparoskopický odběr ovariální tkáně (vlastní materiál): a. odběr ovariálního kortexu, b. odebraný vzorek, c. ovarium po odběru a koagulaci okrajů rány, d. náhledná biopsie z ovaria po ošetření koagulací

steroidů a gonadotropinů. Tato laboratorní metoda je běžně dostupná a levná. Perspektivní a citlivější se jeví sledování nových markerů a ukazatelů ovariální funkce a rezervy – inhibinů (INH A, INH B) a antimüllerianského hormonu (AMH). Jejich hladiny začínou v krvi stoupat o několik týdnů dříve, než je v krvi detekován signifikantní pokles gonadotropinů.

Další alternativou při sledování funkce autotransplantátu je bioptická verifikace s následnou histopatologickou analýzou či s využitím metod molekulární biologie (FISH či PCR sondy na struktury ovariální tkáně). Zásadní nevýhodou tohoto postupu je jeho invazivita a riziko dalšího snížení funkční rezervy transplantovaného vzorku.

ry střev – tzv. Kruckenbergerův tumor). U systémových nádorových onemocnění hematopoiezy, jako jsou leukémie, toto riziko není přesně známo a měly by být zvažovány jiné možnosti ochrany ovariální funkce popsané v úvodu článku. Před zamražením a zejména před autotransplantací by měla být provedena histologická či imunohistochemická analýza částí vzorku, která může odhalit potenciální možnost výskytu maligních buněk s ohledem na typ základního onkologického onemocnění. Kontraindikací této metody by zcela jistě měla být genetická zátěž pro vznik karcinomu prsu a ovaria – pozitivita genu pro Breast Cancer Antigen (BRCA1,2).

Tab. 3. Kryokonzervační protokoly – kryokonzervace ovariální tkáně (upraveno podle Csok DA, et al. Eur. J. Obstet. [33])

Protokol s dimethyl-sulfoxidem (DMSO)	Protokol s 1,2-propandiolem (PROH)
Vznik 1994	Vznik 1996
Plátky ovariálního kortexu tloušťky 1 mm	Plátky ovariálního kortexu (2mm x 4mm x 1mm)
Dehydratace: roztok 1.5M DMSO + 10% Leibovitz L-15 medium, 15 minut	Dehydratace: roztok 1.5M PROH + 0,1M surcoza-fosfát + 10mg/ml lidský sérový albumin, 90 minut
Pomalé zamražení: 2 °C/min do -7 °C, 0,3 °C/min do -40 °C, 10 °C/min do -140 °C, uložení v tekutém dusíku	Pomalé zamražení: 2 °C/min do -7 °C, 0,3 °C/min do -30 °C, 50 °C/min do -150 °C, uložení v tekutém dusíku
Rychlé rozmražení: 2 min. na vzduchu 24 °C, 3x 2 min. ve vodní lázni 22 °C	Rychlé rozmražení: 2-3 min. ve vodní lázni 37 °C

Tab. 4. Soubor pacientů, u nichž došlo ke kryokonzervaci ovariální tkáně na Gynékológico -porodnické klinice v Brně

Č.pac.	Věk	Parita	Onkol. diag.	Následná onkol. léčba	Dispenz.
1	24	0	NHL	CHT (R-CHOP) + RT 30 Gy	Relaps
2	19	0	HL	CHT (BEACOPP) + RT 30 Gy	Remise
3	31	0	HL	CHT (ABVD) + RT 35 Gy	Remise
4	28	0	Ca cerv. uteri	Radik. trachelektomie + RT	?
5	22	0	HL	CHT (BEACOPP) + RT	?

Vysvětlivky: HL – Hodgkinův lymfom, NHL – Non-Hodgkin lymfom, CHT(x) – chemoterapie(režim), RT – radioterapie

V případě dlouhodobé remise onkologického onemocnění je možné uvažovat o využití autotransplantátu k získání oocytů s jeho následným oplozením a vznikem embrya. V případě ortotopické transplantace je teoreticky možná i spontánní koncepce, i když s nízkou šancí na úspěch. Jako účinnější a nutně v případě heterotopické transplantace se ukazuje využití ovariální stimulace gonadotropiny a následně využití technik odběru oocyty (OR – oocyte retrieval) a in vitro fertilizace (IVF).

#### Bezpečnost kryokonzervace ovariální tkáně

Odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky v celkové anestezii, kdy rizika spojená s tímto zákrokem většinou nevedou k závažným komplikacím s nutností odložení onkologické léčby, nicméně je nelze podceňit a pacientka musí být důkladně poučena formou pohovoru s operátorem a písemného informovaného souhlasu.

Velmi podstatná je otázka rizika recidivy nádorového onemocnění po autotransplantaci v důsledku přenosu nádorových buněk spolu s ovariální tkání. Většina solidních nádorů v ovariu metastázy netvoří. U některých nádorových onemocnění jsou popsány metastázy do ovaria (např. lobulární karcinom prsu, některé nádory

#### Doporučení pro praxi

Kryokonzervace ovariální tkáně je metoda v posledních letech intenzivně rozvíjená. V některých zemích již vznikla celá řada specializovaných laboratoří a center, která nabízejí tuto metodu ženám v reprodukčním věku. Odborná debata o výhodách a potenciálních rizicích vedla k vytvoření expertní pracovní skupiny a doporučeného postupu Americké Společnosti pro Reprodukční Medicínu (ASRM) [30]. Přestože doporučení bylo vydáno již v roce 2004, je v něm mimo jiné konstatováno:

- \* jedná se o dosud experimentální metodu,
- \* má být vyžadován písemný souhlas pacienta a souhlas etické komise,
- \* nezbytnost mezioborové spolupráce - gynekolog, patolog, onkolog, embryolog, genetik, psycholog,
- \* metoda by neměla být komerčně nabízena jako produkt reprodukčního stárnutí.

V Evropě v dubnu roku 2004 vstoupila v platnost směrnice Evropské unie č. 2004/23/EC o darování, zprostředkování, testování, zpracování, ochraně, skladování a šíření lidských tkání a buněk. Tato směrnice stanovuje minimální standardy a podmínky pro pracoviště, které se



zabývají těmito postupy. Uplatňování těchto pravidel může významným způsobem snížit dostupnost těchto lékařských postupů a služeb, na druhé straně zajišťuje maximální bezpečnost a kvalitu.

## VLASTNÍ ZKUŠENOSTI S TECHNIKOU KRYOKONZERVACE OVARIÁLNÍ TKÁNĚ

Ve spolupráci s interní hemato-onkologickou klinikou Fakultní nemocnice Brno byl na našem pracovišti v období od ledna 2005 dosud proveden odběr a zamrazení ovariální tkáně u 5 onkologických pacientek. Indikace k výkonu a podrobnější charakteristiku pacientek shrnuje tabulka 4. Ve všech případech byly laparoskopickou technikou z každého ovaria odebrány 1-2 proužky ovariálního kortexu velikosti max. 5x10 mm s tloušťkou do 2 mm (obr. 4). Z každého ovaria byla dále ze 2 míst provedena náhodná biopsie a získané vzorky do velikosti 1 x 1 mm byly vyšetřeny histologicky ke stanovení počtu primordiálních folikulů jako ukazatele ovariální rezervy a vyloučení přítomnosti maligních buněk. Získaná tkáň byla zpracována a zamrazena podle kryokonzervačního protokolu s 1,2-propandiólem (viz tab. 3). Všechny pacientky zařazené do studie byly seznámeny s metodou a podepsaly informovaný souhlas. Projekt byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice Brno. Žádný ze zamražených vzorků nebyl zatím použit ke transplantaci. Realizace tohoto finančně a organizačně náročného projektu je v současné době možná pouze díky podpoře Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky č. NR/8469 - 3.

## DISKUSE

Kryokonzervace ovariální tkáně ve srovnání s kryokonzervací oocytů či embryí po jejich oplození má zásadní výhodu v tom, že při ní není nutná ovariální stimulace gonadotropiny a rizika s ní spojená (ovariální hyperstimulační syndrom, možné zánětlivé či trombotické komplikace). Navíc ovariální stimulace je relativně kontraindikována u hormonálně senzitivních nádorů (diskutuje se zejména o karcinomu prsu), kdy by po této terapii mohlo dojít k rychlejší progresi či diseminaci primárního nádorového ložiska. Významný je také fakt, že není nutné odkládat zahájení onkologické léčby o 2-3 týdny kvůli ovariální stimulaci.

Minimalizace ischemického traumatu tkáně během odběru a zpracování je velmi důležitým faktorem pro fungování štěpu. Menší senzitivitu na ischemické trauma vykazují primordiální folikuly, naopak větší procento poškození je možno pozorovat u okolních granulózových buněk. Ukazuje se, že procento přežívání je závislé na

stupni diferenciace buňky a také počtu a typu buněčných organel. Přesto jsou výsledky s kryokonzervací ovariální tkáně daleko povzbudivější ve srovnání s kryokonzervací oocytů. Další zlepšení výsledků je možné při použití nových kryobiologických technik, jako je vitifikace (velmi rychlé zmrazení po přelití vzorku tekutým dusíkem). Slibnou cestou do budoucna může být také zdokonalení technik zamrazení celého ovaria. Nedávno Martinez-Madrid prokázal velmi dobré výsledky přežívání primordiálních folikulů po zamrazení a následném rozmrazení celého lidského ovaria [31]. Také Bedaiwy ve své práci provedené s ovčími vaječnými dosahuje vynikajících výsledků při autotransplantaci celého vaječniku s použitím technik mikrovaskulární anastomózy [28]. Hlavním problémem tohoto postupu je nalezení vhodné metody uchování celého ovaria včetně jeho krevního řečiště.

Velikost funkční ovariální rezervy po transplantaci ovariální tkáně je základním předpokladem pro dlouhodobou funkci štěpu. Histologickým studiem byla prokázána velmi nepravidelná distribuce primordiálních folikulů v kortexu ovaria, které jsou morfologickým korelátem jeho funkce. Zatím není možné validně předpovědět dobu fungování chemoterapií či jinak poškozeného ovaria, a tudíž ani štěpu ovariální tkáně po autotransplantaci.

Před použitím zamrazené ovariální tkáně nutně vyvstane otázka, jak brzy po úspěšném ukončení onkologické léčby je vhodné ženě nabídnout transplantaci ovariální tkáně. Rozhodnutí závisí zejména na zdravotním stavu a výsledcích vyšetření během dispenzarizace na příslušném onkologickém pracovišti. Obecně se doporučuje transplantace ovariální tkáně nejdříve po dvou letech trvání remise onkologického onemocnění.

## ZÁVĚR

Přestože mnoho nových studií popisuje obnovení funkce tkáně vaječniku po autotransplantaci a navzdory tomu, že již bylo opakovaně popsáno narození dítěte po použití těchto technik u člověka, je potřeba si uvědomit, že stále mnoho otázek celého výše popsaného procesu zůstává nezdověáno. Při indikaci je vždy nutno přihlídnout k celkovému zdravotnímu i psychologickému stavu ženy a postupovat přísně individuálně. Přes výrazné pokroky v kryobiologii je nutno stále považovat kryokonzervaci ovariální tkáně za metodu experimentální. Praktická realizace tohoto postupu zcela jistě vyžaduje včasnou a úzkou spolupráci klinického onkologa, gynekologa - specialisty na reprodukční medicínu a embryologa.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR - NR/8469 - 3.

Literatura u autora.

## **PUBLIKACE XIX**

LETTER TO THE EDITOR

## Methods for preserving fertility in young women suffering from cancer: some aspects of ovarian tissue cryopreservation

Zakova J<sup>1</sup>, Sedlackova M<sup>2</sup>, Polak S<sup>3,4</sup>, Dumkova J<sup>2</sup>, Ventruba P<sup>1</sup>, Crha I<sup>1</sup>

Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic.  
stefan.polak@fmed.uniba.sk

Dear Editor-in-Chief, Bratislava Medical Journal,

A great interest increases in revealing the pathogenesis of oncologic diseases by experimental tumorigenesis to perform early diagnosis and treatment strategies (1). New methods of cancer therapy, often aggressive, now bring questions such as: how to prevent the decrease in ovarian function and fertility in young women suffering from cancer. The purpose of our paper is to review shortly the current methods. Our preliminary ultrastructural study shows that the method of cryopreservation of human ovarian tissue causes minimal structural changes in primordial and primary ovarian follicles.

The human ovarian cortex is populated by a finite store of primordial germ cells. They migrate during the early fetal life from the wall of the yolk sac into the developing ovaries (forming from a paired indifferent gonad). The germ cells of endodermal origin differentiate later into oogonia. The oogonia in ovary are surrounded by stromal cells derived from coelomic epithelium, and develop into follicular or granulosa cells. The follicular cells are flattened at the beginning and later, during the ovarian cycle they become polyhedral repeated divisions of oogonia as well as follicular cells form the immature primordial follicle. These follicles are continuously involved in the growth of antral follicles, but just a few of them are preferred to mature until ovulation (2, 3). In humans and in other primates as well, only one single follicle reaches the pre-ovulatory stage each cycle; most follicles fail in this maturation scheme and die in the apoptotic process termed atresia (4). A female child is born with 1–2 million primordial follicles in its ovarian cortex. The number of follicles reduces by speed of 1,000 follicles per month, and at menarche, there are 400,000 follicles available. Even though menopause marks a definitive end of

the reproductive lifespan with exhaustion of follicles, the female fertility already initiates to decrease at the age of 30 years. By the age of 40 years, the incidence of significant problems with human fertility is already marked, in both spontaneous and assisted conceptions (5, 6). Fertility difficulties are particularly caused by a stable injurious effect of environment (7).

The number of 450 matured follicles approximately is a sufficient amount for the whole reproductive life of a female. But some anticancerous treatment schemes are excessively aggressive and besides the successful cancer-treating effect in many young women, they lose both ovarian endocrine function and fertility (8). Ionizing radiation and the majority of alkylating agents can often induce early ovarian failure, rendering the patient infertile. For instance, intensive chemotherapy and radiotherapy, prior to bone marrow transplantation, used in the treatment of some hematologic diseases, can also result in ovarian failure (9). The precise mechanism of follicular damage induced by chemo or radiotherapy is not yet well understood. Ovarian impairment caused by radiotherapy depends on the position of abdominal radiotherapy field. Moreover, there are no human studies considering the quality of oocytes and embryos derived from a prior course of chemotherapy (10).

Methods of preserving the fertility in young women can be divided into three cryopreservative methods, namely those preserving the embryo, mature oocytes, or ovarian tissue. Cancer patients can undergo follicle aspiration followed by *in vitro* fertilization and have their embryos stored in freeze bank prior to the treatment, or during a suitable break in it (11). In 1985, Mohr and Trounson (12) report about the first successful delivery after the frozen human embryo transfer. Today, the rate of achievement following the procedure is high. Unfortunately, barely a limited number of oocytes can be collected and the technique is not generally applicable in all cancer patients. For example, ovarian stimulation is contraindicated in malignant estrogen-sensitive tumors such as carcinoma of breast. The method seems to be inappropriate for prepubertal girls and often unacceptable to single women who do not wish to use donor spermatozoa (5). According to several reports (13, 14), cryopreservation increases the incidence of monozygotic twinning, although other reports indicate that no such relationship exists (15, 16). Repiska et al (17) described a very rare case of octuplet pregnancy following cryo-embryo transfer.

<sup>1</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>3</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia, and <sup>4</sup>University Centrum of Reproductive Medicine of the 1st Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital in Bratislava, Bratislava, Slovakia

**Address for correspondence:** S. Polak, MD, PhD, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, SK-811 08 Bratislava, Slovakia.  
Phone: +421.2.59357236



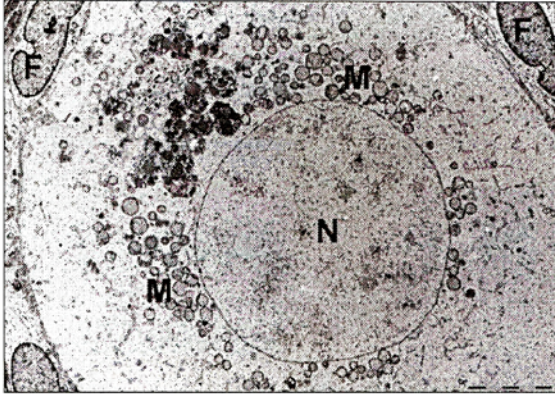


Fig. 1. Primordial follicle from a "fresh" ovarian cortex. Large, pale nucleus (N) and perinuclear distribution of organelles, mostly mitochondria (M). Flattened follicular cells (F) surrounding oocyte (TEM, line in Fig. = 5 µm).

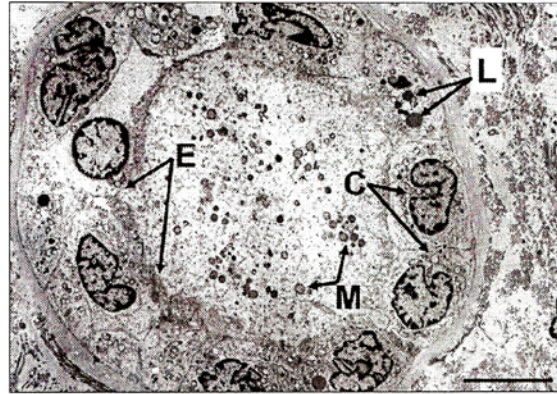


Fig. 3. Primary follicle after cryopreservation with prominent morphological alterations. In cytoplasm of oocyte there are mitochondria (M), the oolema is more undulated and interrupted in more places. The cytoplasm of follicular cells is vacuolated (C) and contains lipid and lipofuchsin droplets (L) (TEM, line in Fig. = 5 µm).

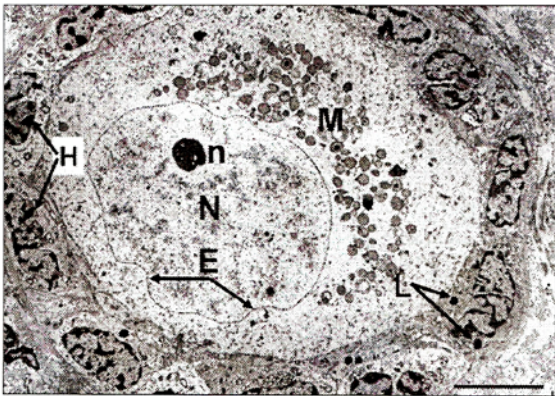


Fig. 2. Primary follicle after cryopreservation with minimal morphological alterations. Large and pale nucleus (N) with marked nucleolus (n). The nuclear envelope (E) of oocyte is undulated. Follicular cells have a higher accumulation of heterochromatin (H) in nuclei, and more lipid droplets (L) in cytoplasm (TEM, line in Fig. = 5 µm).

Human mature oocyte cryopreservation represents a valid alternative to legal, moral and religious problems encountered in association with embryo freezing since it does not require the presence of a male partner and thus has an undoubtedly positive impact on assisted reproduction techniques. The first birth after human oocyte cryopreservation was reported by Chen (18) in 1986. The pregnancy rates after embryo transfer from frozen oocytes stay still very low (1 % to 5 %) even though such a long period had gone. There are various reasons for this limited success, namely low oocyte survival degree, low fertilization rate after traditional *in vitro* fertilization, high incidence of polypoidy, and poor developmental ability of embryos (10). Recently, the first successful fertility preservation with frozen mature oocytes in cancer patient has been reported by Yang et al in 2007 (19).

The idea of ovarian tissue cryopreserving as a whole is based on the invention that the primordial follicles protected by ovarian

cortex are more resistant to cryo-injury than the mature oocytes are. The oocytes in primordial follicles of ovarian cortex are small, not yet completely developed, with few organelles, with no covering of *zona pellucida*, and are relatively metabolically quiescent and undifferentiated in comparison with mature oocytes (20). But the greatest risk with ovarian tissue cryopreservation is the possibility that by autografting a frozen-thawed ovarian strip it is possible to re-convey a tumor harbored within the ovary (21). In 2004, Donnez et al (22) described a first live birth after orthopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Their findings suggest that cryopreservation of ovarian tissue should be offered generally to all young women with cancer diagnosis. Other authors assume that it is too soon to recommend this technique on a routine basis (23).

Numerous morphological works deal with the ultrastructural characteristics of frozen and thawed human mature oocytes. Most of them describe a variety of ultrastructural alterations, like an increased density of the inner part of *zona pellucida*, in some cases a delamination of *zona pellucida*, or vacuolization of oocyte cytoplasm (24–27). Nevertheless, so far we have found only three studies to be dealing with ultrastructural changes of oocytes and follicular cells after ovary cryopreservation of which two were conducted in humans (28–30) and one in mice (31).

In our preliminary study, we investigated frozen and thawed tissue stripes of ovarian cortex after laparoscopy in a 21-year-old woman. A small sample of ovarian tissue was immediately fixed with 3 % glutaraldehyde, post-fixed with 1 % OsO<sub>4</sub> in phosphate buffering solution and embedded in Durcupan ACM. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The rest of ovarian tissue was frozen and stored in 1,2-propanediol for two months. After thawing in 37 °C water bath, the tissue was prepared for transmission electron microscopic examination with the same method.

We found numerous primordial and primary follicles in tissue samples from "fresh" ovarian tissue, as well as from the frozen and thawed tissue. The "fresh" primordial follicle as seen in



Fig 1 normally contains an oocyte with a large pale nucleus, and perinuclear distribution of organelles (mostly mitochondria). The follicular cells have also large and pale nuclei with abundant euchromatine. After the freezing and thawing procedure the most remarkable changes we observed surprisingly not in oocytes but in follicular cells and other stromal cells. These changes in morphology of follicular cells include intense condensation of heterochromatine in nuclei, changes in mitochondrial morphology and an increase in lipid droplets density (Figs 2 and 3). Most of frozen and thawed oocytes had entire oolema as well as nuclear envelope. The ultrastructure picture of oocytes with normal morphological features and perinuclear distribution of organelles shows that these oocytes seem to be viable. We assume, that cryopreservation of ovarian tissue represents an effective alternative or an addition to cryopreservation of embryos or oocytes for women at risk of premature ovarian failure due to chemotherapy.

## References

1. Valaskova Z, El-Hassoun O, Galfiova P, Jakubovsky J, Danihel L, Hulin I. Perspective and complexity of experimental cancer study. The secrets of tumorigenesis. (To the Gupta's, Chaffer's and Weinberg's "perspectives" and to the Nurse's "horizons"). Bratisl Lek Listy 2010; 111 (1): 9–12.
2. Jiménez R. Ovarian organogenesis in mammals: mice cannot tell us everything. Sex Dev 2009; 3 (6): 291–301.
3. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. J Clin Invest 2010; 120 (4): 963–972.
4. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev 1996; 17: 121–155.
5. Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. Hum Reprod Update 1998; 3 (3): 237–247.
6. Perheentupa A, Huhtaniemi I. Aging of the human ovary and testis. Mol Cell Endocrinol 2009; 299 (1): 2–13.
7. Ray B, Potu BK. Ovarian folliculogenesis: Detrimental effect of prenatal exposure to cyclophosphamide: a preliminary study. Bratisl Lek Listy 2010; 111 (7): 369–372.
8. Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G, Orrico C, Di Tommaso B, Venturoli S. Cryopreservation of human ovarian tissue. Cell Tissue Bank 2006; 7: 123–133.
9. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. Semin Hematol 1999; 10: 95–103.
10. Tao T, Del Valle A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. J Assist Reprod Genet 2008; 25: 287–296.
11. Brown JR, Modell E, Obasaju M, King YK. Natural cycle in vitro fertilization with embryo cryopreservation prior to chemotherapy for carcinoma of the breast. Hum Reprod 1996; 11: 197–199.
12. Mohr LR, Trounson AO. Cryopreservation of human embryos. Ann NY Acad Sci 1985; 442: 536–543.
13. Toledo MG. Is there increased monozygotic twinning after assisted reproductive technology? Aust N Z J Obstet Gynaecol 2005; 45: 360–364.
14. Faraj R, Ebuomwan I, Sturgiss S, Aird I. Monozygotic triplet pregnancy following egg donation and transfer of single frozen-thawed embryo. Fertil Steril 2008; 89: 1260.e9–12.
15. Alikani M, Cekleniak NA, Walters E, Cohen J. Monozygotic twinning following assisted conception: an analysis of 81 consecutive cases. Hum Reprod 2003; 18: 1937–1943.
16. Blickstein I, Jones C, Keith LG. Zygotic-splitting rates after single-embryo transfers in in vitro fertilization. N Engl J Med 2003; 348: 2366–2367.
17. Repiska V, Lehocný I, Danišovič E, Varga I, Böhmer D, Danihel E, Galbavý Š. Octuplet pregnancy following intracytoplasmic sperm injection and cryo embryo transfer. Med Sci Monit 2009; 15 (9): CS143–147.
18. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet 1986; 2: 884–886.
19. Yang D, Brown SE, Nguyen K, Reddy V, Brubaker C, Winslow KL. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. Fertil Steril 2007; 87: 1469.
20. Nugent D, Meirow D, Brook PF, Aubard Y, Gosden RG. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. Hum Reprod Update 1997; 3: 267–280.
21. Sonmezer M, Shamoni MI, Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation: benefits and risks. Cell Tissue Res 2005; 322: 125–132.
22. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squiffet J, Martínez-Madrid B, van Langendonck A. Livebirth after orthopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 2004; 364: 1405–1410.
23. Oktay K, Tilly J. Correspondance: Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. Lancet 2004; 364: 2091–2092.
24. Nottola SA, Cotichio G, De Santis L, Macchiarelli G, Maione M, Bianchi S, Iaccarino M, Flamigni C, Borini A. Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation with ethylene glycol. Reprod Biomed Online 2008; 17 (3): 368–377.
25. Nottola SA, Macchiarelli G, Cotichio G, Bianchi S, Cecconi S, De Santis L, Scaravelli G, Flamigni C, Borini A. Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. Hum Reprod 2007; 22 (4): 1123–1133.
26. Nottola SA, Cotichio G, Sciajno R, Gambardella A, Maione M, Scaravelli G, Bianchi S, Macchiarelli G, Borini A. Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. Reprod Biomed Online 2009; Suppl 3: 17–27.
27. Cotichio G, Borini A, Distratis V, Maione M, Scaravelli G, Bianchi V, Macchiarelli G, Nottola SA. Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols. J Assist Reprod Genet 2010; 27 (4): 131–140.
28. Camboni A, Martínez-Madrid B, Dolmans MM, Amorim CA, Nottola SA, Donnez J, Van Langendonck A. Preservation of fertility in young cancer patients: contribution of transmission electron microscopy. Reprod Biomed Online 2008; 17 (1): 136–150.
29. Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G, Orrico C, Di Tommaso B, Venturoli S. Cryopreservation of human ovarian tissue. Cell Tissue Bank 2006; 7 (2): 123–133.
30. Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G, Orrico C, Paradisi R, Seracchioli R, Venturoli S. Fetal calf serum versus human serum: ultrastructural evaluation of protein support influence on human ovarian tissue cryopreservation. Ultrastruct Pathol 2006; 30 (4): 253–260.
31. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. Fertil Steril 2000; 74 (1): 122–129.

Received October 18, 2010.

Accepted January 9, 2012.

## **PUBLIKACE XX**



## Kryokonzervace ovariální tkáně u onkologických pacientek – 6 let klinických zkušeností

Čes. Gynek.  
2012, 77, č. 2  
s. XXX-XXX

### Ovarian tissue cryopreservation in cancer patients – six years of clinical experience

Huser M.1, Žáková J.1, Crha I.1, Šmardová L.2, Král Z.2, Revel A.3, Ventruba P.1

<sup>1</sup>Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a Fakultní nemocnice Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

<sup>2</sup>Interní hemato-onkologická klinika LF MU a Fakultní nemocnice Brno, přednosta prof. MUDr. J. Mayer, CSc.

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Hadassah University Hospital Ein-Karem, Jerusalem, Izrael, Head prof. N. Laufer

#### ABSTRACT

**Objective:** Presentation of clinical results and experience with this technique during past six years.

**Design:** Original paper.

**Settings:** Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno, Interní hemato-onkologická klinika LF MU a FN Brno, Department of Obstetrics and Gynecology. Hadassah University Hospital Ein-Karem, Jerusalem, Izrael.

**Introduction:** Ovarian tissue cryopreservation (OTC) and its future auto-transplantation becomes an alternative for patients to prevent serious damage of ovarian function by oncology treatment.

**Methods:** Patient is indicated to OTC in case of high risk of ovarian failure due to planned chemotherapy and impossibility to use other oncofertility techniques. Ovarian tissue harvesting is done by laparoscopy in short-term general anesthesia. After tissue processing the samples are cryopreserved in programmable automatic freezer or by vitrification. The auto-transplantation of ovarian tissue is planned after the complete cure of patient's malignancy. Our workplace doesn't have own experience with tissue transplantation – until now cryopreserved tissue has not yet been utilized by the patients. Clinical experience with this technique gained by our team during academic stay in abroad Israeli clinic is presented.

**Results:** During the years of 2005–2011 the OTC was performed in 19 cancer patients before chemotherapy. In majority of cases, patients suffered from blood or lymph node systemic malignancy (84%). Average age of women was 26 years. The patient set consisted of mostly nulliparous women (88%). Patient's average body mass index was 23,9 kg/m<sup>2</sup>. The length of systemic chemotherapy averaged 7.1 months. Time from fertility preservation counseling to chemotherapy was not exceeding one week (7.2 days on average). Ovarian tissue harvesting was conducted by laparoscopic surgery in all cases. The length of surgery did not exceed 60 minutes and no surgical complications were observed. The case of ovarian tissue transplantation performed on abroad university settings is discussed.

**Conclusion:** In the consensus of with international guidelines OTC is offered to patients with high risk of ovarian failure due to cytotoxic oncology treatment. Research in the field of oncofertility is focused on the techniques of in-vitro folliculogenesis in retrieved ovarian tissue.

**Key words:** cancer, infertility, fertility preservation, ovarian tissue cryopreservation, oncofertility.

#### SOUHRN

**Cíl studie:** Prezentace výsledků kryokonzervace ovariální tkáně u pacientek podstupujících onkologickou léčbu.

**Typ studie:** Původní práce.

**Název a sídlo pracoviště:** Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno, Interní hemato-onkologická klinika LF MU a FN Brno, Department of Obstetrics and Gynecology. Hadassah University Hospital Ein-Karem, Jerusalem, Izrael

**Úvod:** Jednou z možností prevence poškození ovaria onkologickou léčbou je kryokonzervace ovariální tkáně (KOT) s možností její autotransplantace po vyléčení nádorového onemocnění. Cílem této práce je prezentace klinických zkušeností s touto technikou za šestileté období na univerzitním pracovišti v rámci Centra ochrany reprodukce.

**Metodika:** V případě vysokého rizika ovariálního selhání v důsledku plánované onkologické léčby a nemožnosti využití jiných technik reprodukční ochrany je pacientka indikována ke KOT. Odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky za krátkodobé hospitalizace. Po zpracování vzorku je vlastní kryokonzervace realizována s použitím programovatelného mrazicího zařízení nebo pomocí vitrifikace.

K autotransplantaci ovariální tkáně přistupujeme v období po vyléčení zhoubného nádoru. Na vlastním pracovišti nemáme dosud vlastní zkušenosti s transplantací ovariální tkáně. Dosud kryokonzervovaná ovariální tkáň zatím nebyla k transplantaci použita. Jsou popsány klinické zkušenosti autora s touto technikou během akademické stáže na zahraničním pracovišti v Izraeli.

**Výsledky:** V období leden 2005 – leden 2011 byla provedena KOT u 19 pacientek před onkologickou léčbou. Ve většině případů (84 %) šlo o pacientky s hematologickými malignitami. Průměrný věk pacientek byl 26 let. V souboru dominovaly nulipary (88 %). Průměrný věk pacientek byl 26,7 let. Průměrný index tělesné hmotnosti (BMI) pacientek ve sledovaném souboru byl 23,9 kg/m<sup>2</sup>. Délka systémové léčby činila průměrně 7,1 měsíců. Průměrný čas do zahájení chemoterapie nepřesahoval jeden týden (průměr 7,2 dnů). Odběr ovariální tkáně byl prováděn ve všech případech laparoskopickou metodou. Délka operačního výkonu nepřesáhla dobu 60 minut. Nebyly zaznamenány žádné významné operační komplikace. Autoři dokumentují případ autotransplantace kryokonzervované ovariální tkáně uskutečněný na zahraničním univerzitním pracovišti.

**Závěr:** Ve shodě s mezinárodními doporučeními je KOT nabízena pacientkám s významným rizikem ovariálního poškození v důsledku chemoterapie. Výzkum v oblasti onkofertilitě se zaměřuje na možnosti zajištění folikulogeneze v odebrané ovariální tkáni v prostředí in vitro.

**Klíčová slova:** nádorové onemocnění, neplodnost, ochrana reprodukce, kryokonzervace ovariální tkáně, onkofertilita.

## ÚVOD

Souvislost mezi poškozením reprodukčních funkcí a onkologickou léčbou je známa již několik desetiletí. S narůstající úspěšností onkologické léčby roste význam těchto negativních dopadů na fertilitu ženy. Trvalá ztráta reprodukčního potenciálu patří mezi nejčastější nežádoucí účinky onkologické léčby. Jednou z možností prevence poškození ovaria onkologickou léčbou je kryokonzervace ovariální tkáně (KOT) s možností její autotransplantace po vyléčení nádorového onemocnění [14]. Hlavním cílem této strategie je zachovat tkáň ovariálního kortexu obsahující primordiální folikuly k autotransplantaci v době, kdy bude pacientka trvale vyléčena z onkologického onemocnění [6, 8, 19]. V literatuře byla popsána úspěšná autotransplantace ovariální tkáně zatím u několika desítek pacientů na světě [2, 7, 9, 24]. První porod zdravého dítěte po transplantaci zamražené ovariální tkáně popsal Belgičan Donnez v roce 2004 u 25leté ženy dříve léčené chemoradioterapií pro Hodgkinův lymfom v pokročilém IV. stadiu [8].

První pokusy o kryokonzervaci a transplantaci ovariální tkáně se datují do roku 1950. Bohužel pro nedostatek účinných kryokonzervačních metod a technického vybavení byly jejich výsledky nevalné a málo povzbudivé. S rozvojem kryobiologie v 90. letech minulého století přichází rozvoj této metody také v humánní medicíně. Na rozdíl od kryokonzervace embryí či oocytů je ovariální tkáň daleko komplexnější a obsahuje více druhů buněk – stromální buňky, folikulární buňky a oocyty. Standardní metodou kryokonzervace ovariální tkáně je technika pomalého mražení v médiu obsahujícím lidský sérový albumin a sucrozu s využitím propandiolu, dimethylsulfoxidu či ethylenglykolu jako kryoprotektantů [12]. Využití těchto kryokonzervačních technik vede k přežití až 70 % všech primordiálních folikulů v zamraženém vzorku ovariální tkáně [20].

Ovariální tkáň obsahující gamety může být zpracována několika způsoby. Největší klinické zkušenosti existují s kryokonzervací fragmentů (proužků) ovariálního kortexu. Jsou také popsány klinické zkušenosti s odběrem a kryokonzervací celého ovaria s vaskulární stopkou. Autotransplantaci celého lidského ovaria s mikroanastomózou v roce 2004 úspěšně realizoval Martinez-Madrid. Problémem této metody u větších savců je nedostatečná difuze kryoprotektantu do celého orgánu a poškození kapilár ledovými krystaly. Dalším technickým úskalím je vysoké riziko trombózy v reanastomozovaném vaskulárním pelikulu [15]. Jinou možnou strategií zpracování ovariální tkáně představuje izolace primordiálních folikulů obsahujících oocyty a jejich kryokonzervace samostatně bez doprovodných ovariálních buněk. Primordiální folikuly (PMF) jsou velmi rezistentní k poškození nízkými teplotami – mají energeticky nenáročný metabolismus, malou velikost (30–40 mikrometrů) a absenci cytoskeletu.

U pacientek s předčasným ovariálním selháním v důsledku onkologické léčby, může být kryokonzervovaná ovariální tkáň využita buď k transplantaci zpět do těla pacientky, nebo může sloužit k in vitro maturaci PMF s cílem získat haploidní oocyt schopný fertilizace pomocí běžných metod asistované reprodukce. Ortotopickou transplantací označujeme vložení ovariální tkáně zpět do funkčně inaktivního ovaria či jeho bezprostředního okolí v malé pánvi. Heterotopická transplantace znamená umístění štěpu do jiné, většinou lépe přístupné oblasti těla ženy. V případě ortotopické transplantace je teoreticky možné dosažení gravidity spontánní koncepcí za předpokladu nepoškozených vejcovodů a dělohy. V ostatních případech je možné dosáhnout těhotenství pouze pomocí ovariální stimulace a cyklu in vitro fertilizace (IVF). K minimalizaci rizika rekurence nádorového onemocnění se jako efektivnější jeví technika in vitro kultivace PMF izolovaných z ovariální tkáně. Již dnes je technicky možné in vitro kultivovat lidské PMF až do



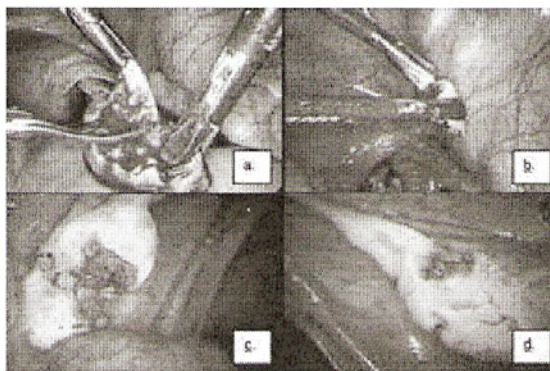
stadia folikulogeneze, které je pro fertilizaci dostatečné. Je pravděpodobně jen otázkou času, kdy takto vzniklý oocyt bude použit k oplodnění a k narození zdravého dítěte [26]. Zajímavá je také myšlenka využití laboratorních zvířat jako inkubačních médií k dlouhodobému uchovávání a také maturaci lidské ovariální tkáně. Imodeficientní myši jsou nejčastěji využívány jako recipientní organismy při xenotransplantaci lidské ovariální tkáně. Nejlepší výsledky byly popsány při transplantaci lidské ovariální tkáně do peritoneální dutiny a kapsuly myší ledviny. Po transplantaci byly pomocí ovariální stimulace myší získány maturované (MII) lidské ovocyty [10, 11].

## MATERIÁL A METODY

Centrum ochrany reprodukce (COR) na Gynekologicko-porodnické klinice LF MU a FN Brno nabízí podpůrnou léčbu zaměřenou na zachování reprodukčního potenciálu u pacientů s nově diagnostickým onkologickým či imunologickým onemocněním. Během konzultace je provedeno zhodnocení rizika ovariálního poškození či selhání v důsledku plánované onkologické léčby a pacientce je navržena optimální strategie reprodukční ochrany. Pacientce je popsán podrobně celý postup podpůrné léčby. Při rozhovoru je vhodná také přítomnost partnera či manžela pacientky. Velmi důležitý je zejména čas, který zbývá do zahájení onkologické léčby, či možnost odsunutí začátku léčby.

Metoda kryokonzervace ovariální tkáně byla implementována na našem pracovišti na podkladě dříve publikovaných prací a zkušeností jiných autorů [1, 8, 16, 19]. Před realizací je vyžadován podpis písemného informovaného souhlasu schváleného etickou komisí Fakultní nemocnice Brno. V souladu s evropskou direktivou 2004/23/EC o skládování orgánů a tkání je dále u pacienta nutný odběr krve k vyloučení sexuálně přenosných nemocí pomocí následujících sérologických vyšetření – HIV 1, HIV 2, HBsAg, anti-HBc, anti-HCV.

Odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky za krátkodobé hospitalizace pacientky. Před operací je vyžadováno standardní předoperační vyšetření. Vlastní operační výkon se provádí v celkové anestezii. Při operaci zavádíme do dutiny břišní transumbilikálně kamerový systém a do oblasti podbříšku další dva až tři operační porty. Množství ovariální tkáně odebírané pro účely kryokonzervace je předem dohodnuto s pacientkou. Na našem pracovišti odebíráme nejčastěji vzorek ovariální kůry z obou ovaríí o rozměrech asi 10 x 20 mm a tloušťce 1–2 mm. V případě velkého rizika trvalého ovariálního selhání navrhuje pacientce odběr celého jednoho vaječnicku, tedy unilaterální ovariectomii. K odběru tkáně ovariálního kortexu používáme nůžky a grasper (obr. 1). Tkáň extrahujeme opatrně laparoskopickým portem a ukládáme do kryokonzervačního média G-Fert (Vitrolife). Vzorek ovariální tkáně určený ke kryokonzervaci je transportován do embryologické laboratoře ve speciálním boxu, který udržuje tělní teplotu. Během operace



**Obr. 1.** Laparoskopický odběr ovariální tkáně  
a. odběr ovariálního kortexu; b. odebraný vzorek; c. ovarium po odběru a koagulaci okrajů rány; d. random biopsie z ovaria po ošetření koagulací.

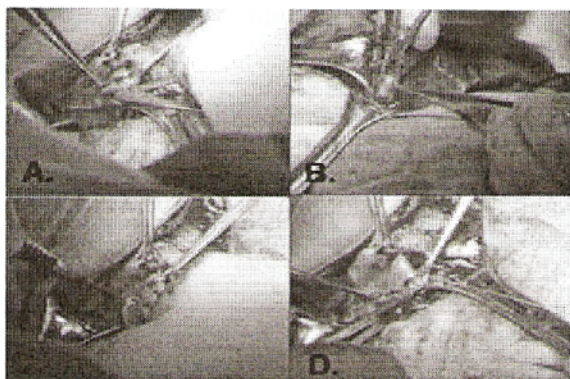
dále provádíme náhodnou (random) biopsii ze tří míst na obou ovaríích k vyloučení infiltrace ovaríí maligními buňkami základního nádorového onemocnění.

V laminárním boxu embryologické laboratoře je získaná ovariální tkáň vyjmuta z transportní komůrky na Petriho misku a přelita stejným kryokonzervačním médiem. V ovariálním kortexu pátráme po rostoucích folikulech o průměru asi 2–5 mm, které odsáváme pomocí jehly a injekční stříkačky. Folikuly mohou obsahovat oocyty, které je možné využít rovněž ke kryokonzervaci, pokud s tímto postupem pacientka při vstupním pohovoru vyjádřila souhlas. Získané vzorky ovariálního kortexu jsou poté skalpelem podélně rozřezány na úzké pásky o velikosti přibližně 5 x 1 mm a o tloušťce 1–2 mm. V případě odběru celého ovaria je nutné nejdříve oddělit ovariální kortex od stromatu vaječnicku. Oddělení je poměrně jednoduché, provádíme jej většinou tupě, digitálně, popřípadě ostře, pomocí nůžek. Ovariální stroma se ke kryokonzervaci nevyužívá, protože neobsahuje primordiální folikuly. Tkáň stromatu je odeslána na patologicko-anatomické vyšetření, abychom vyloučili infiltraci stromatu ovaria nádorovým onemocněním.

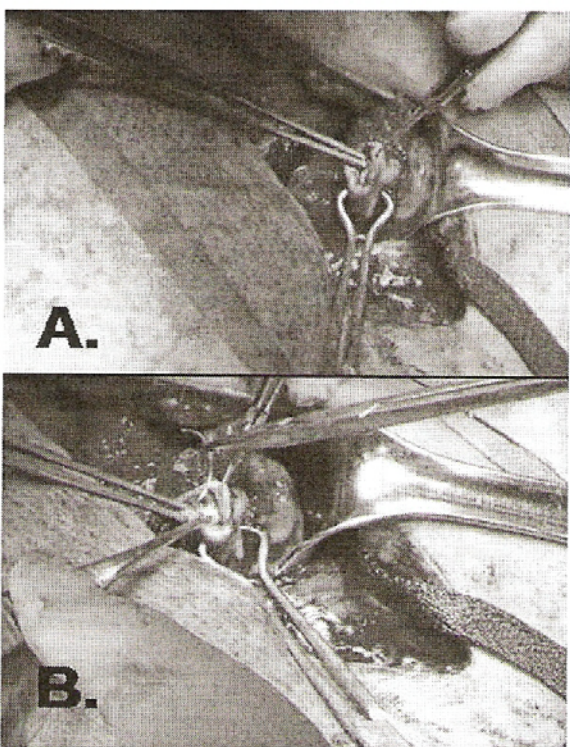
Vlastní kryokonzervaci zpracované ovariální tkáně provádíme dvěma metodami – technikou pomalého zmrazování za použití automatického mrazicího zařízení, nebo metodou vitrifikace. Po inkubaci v kryokonzervačním médiu EFS2 Freezing Kit (Vitrolife) vkládáme proužky ovariální tkáně do kryotub (Nunc) po 4–6 kusech. Kryotuby jsou pečlivě označeny a zamrazeny pomocí kryokonzervačního přístroje Planer Kryo 10. K vitrifikaci používáme komerční vitrifikační kity RapidVit Cleave (Vitrolife, Švédsko) nebo Vitrefication Cooling (MediCult, Dánsko). Vždy postupujeme podle instrukcí výrobce příslušného vitrifikačního kitu. Během procedury nepoužíváme žádné kryokonzervační zařízení, kryotuby s proužky ovariální tkáně jsou ponořeny přímo do tekutého dusíku.

K transplantaci ovariální tkáně přistupujeme po domluvě s pacientkou a se svolením klinického onkolo-





**Obr. 2.** Transplantace proužků ovariálního kortexu do peritoneální kapsy v ligamentum latum uteri (použito se svolením dr. Ariela Revela, Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel)  
A. vytvoření peritoneální kapsy; B, C. vkládání proužků ovariální tkáně; D. uzavření peritoneální kapsy stehem po vložení transplantátu



**Obr. 3.** Transplantace proužků ovariálního kortexu přímo do ovaria (použito se svolením dr. Ariela Revela, Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel)  
A. vytvoření incize v kortexu ovaria; B. vložení proužku ovariálního kortexu a sutura incize

ga, který ji dispensarizuje v období po léčbě zhoubného nádoru. Nezbytnou podmínkou k provedení tohoto postupu je kompletní remise dříve léčeného nádorového onemocnění a dobrý zdravotní stav pacientky. Na našem

pracovišti nemáme dosud vlastní zkušenosti s transplantací ovariální tkáně. Kryokonzervovaná ovariální tkáň všech našich pacientek zatím nebyla k transplantaci použita. Níže popsaný postup ortotopické transplantace a sledování transplantátu byl uskutečněn týmem dr. Ariela Revela během pobytu autora článku na akademické stáži v Hadassah Medical Center v Jeruzalémě na jaře 2009.

K rozmrazení ovariální tkáně se používají komerční sady, např. ThawKit (Vitrolife). Celý proces je potřeba synchronizovat s operací pacientky tak, aby ovariální tkáň byla transplantována do malé pánve co nejdříve po dokončení rozmrazování. Vlastní transplantace byla v Hadassah Medical Center provedena laparotomicky z malého Pfannenstielova řezu do oblasti v ligamentum latum uteri pod ovariem. Cílovou oblast je vhodné lépe vizualizovat tamponádou Douglasova prostoru rouškami. Proužky ovariální tkáně byly vloženy do předem připravené peritoneální duplikatury v ligamentum latum uteri a také přímo do hormonálně inaktivního ovaria. Byly vytvořeny dvě peritoneální kapsy v levém i pravém širokém vaz. Do každé z nich bylo vloženo 3–6 proužků ovariální tkáně. Zbylé proužky byly transplantovány přímo do ponechaného ovaria do hloubky 2–3 milimetrů v ovariálním kortexu. Umístění vzorků a techniku transplantace blíže ozřejmuje fotodokumentace (obr. 2, 3).

Klinickým důkazem dobré funkce transplantátu je obnovení menstruačního cyklu u pacientky s iatrogení amenoreou po chemoterapii. Podle dosud publikovaných prací dochází ke spontánnímu nástupu menstruace většinou do 6 měsíců po transplantaci. Přesnější možnost sledování funkce transplantovaného ovariálního štěpu představuje monitoring hladin gonadotropinů v krvi pacientky. Tato laboratorní metoda je běžně dostupná a levná. Pokud dojde k přihojení štěpu ovariální tkáně, dochází k poklesu hladin gonadotropinů, zejména folikulo-stimulačního hormonu (FSH). Doporučený interval sledování hladin těchto hormonů v krvi je jednou týdně do poklesu FSH pod 20 IU/l či do obnovy spontánního menstruačního cyklu. Poté je možné sledovat tyto parametry méně často a individuálně v závislosti na fázi menstruačního cyklu a podle plánování další léčby neplodností. Perspektivní a citlivější se jeví sledování nových ukazatelů ovariální rezervy – inhibinů (INH A, INH B) a anti-mülleriánského hormonu (AMH) [13]. Jejich hladiny začnou v krvi stoupat o několik týdnů dříve, než je detekován signifikantní pokles FSH. Rutinnímu zavedení do praxe zatím brání vysoká cena biochemických metod detekce těchto látek v krvi. Neinvasivní možností je také sledování funkce transplantátu pomocí vaginální sonografie. Již několik dnů po autotransplantaci je možné detekovat pomocí dopplerovského barevného mapování zvýšený průtok krve při neovaskularizaci v oblasti uložení transplantátu v ligamentum latum uteri. Po několika měsících, většinou až po obnovení menstruačního cyklu, je možné vaginálním ultrazvukem pozorovat růst a vývoj folikulů v transplantované tkáni. Po obnovení funkce štěpu je žádoucí co nejdříve uvažovat o využití autotransplantátu k získání zralých oocytů s jeho následným oplozením a vznikem embrya. V případě ortotopic-



ké transplantace je teoreticky možná i spontánní koncepcí, ale s poměrně nízkou šancí na úspěch. Jako účinnější se ukazuje využití ovariální stimulace gonadotropiny a standardních technik IVF.

## VÝSLEDKY

Technika KOT je rozvíjena na našem pracovišti postupně od začátku roku 2005. V prvních letech po zavedení metody jsme využívali zejména metodu pomalého mrazení pomocí programovatelného zařízení Planer Kryo 10. Od roku 2007 jsme začali kryokonzervovat ovariální tkáň také pomocí metody vitifikace. Jednotlivé případy kryokonzervace provedené na našem pracovišti podrobně charakterizuje tabulka 1. Podrobnější charakteristiku souboru pacientek a výsledky odběru a kryokonzervace ovariální tkáně shrnuje tabulka 2.

Metoda KOT byla na Gynekologicko-porodnické klinice LF MU a FN Brno využita v období leden 2005 – leden 2011 celkem u 19 pacientek před plánovanou gonadotoxickou léčbou. Ve většině případů šlo o pacientky s primární diagnózou hematologické malignity (84 %) – Hodgkinův lymfom (10krát), non-hodgkinový lymfom (5krát) a akutní myeloidní leukémie (jednou). Dále byla metoda využita v jednom případě u pacientky s karcinomem ovaria, jednou u karcinomu jazyka a v jednom případě u ženy se systémovým lupus

erythematodes s orgánovým postižením. Průměrný věk pacientek, které využily metody kryokonzervace ovariální tkáně, byl 26,7 let. Nejmladší pacientka, která se na základně dohody s rodiči rozhodla metodu využít, měla 13 let. V souboru žen dominovaly nulipary (88 %). Průměrná parita v souboru byla 0,1 dítěte v anamnéze. Ve všech případech šlo o ženy středoevropské rasy. Průměrný index tělesné hmotnosti (BMI) pacientek ve sledovaném souboru byl 23,9 kg/m<sup>2</sup>. Délka systémové chemoterapie či imunoterapie činila průměrně 7,1 měsíců. Průměrný čas do zahájení chemoterapie byl v případě kryokonzervace ovariální tkáně velmi krátký a nepřesahoval jeden týden (průměr 7,2 dnů).

Odběr ovariální tkáně byl prováděn ve všech případech laparoskopickou metodou v celkové anestezii. Délka operačního výkonu nepřesáhla dobu 60 minut. Ve sledovaném souboru pacientek jsme nezaznamenali žádné pooperační ani pooperační komplikace. Pacientky byly hospitalizovány maximálně 2 dny. Podle našich zkušeností je možné zahájit systémovou léčbu onkologického onemocnění již za 2 až 3 dny od odběru ovariální tkáně, pokud byl odběr proveden námi popsanou technikou. Ve většině případů (89,5 %) jsme ženě pro účely kryokonzervace odebrali vzorek ovariální kůry o rozměrech asi 10 x 20 mm a tloušťce 1–2 mm z obou ovarii. Ve dvou případech byl pro velmi vysoké riziko trvalého ovariálního selhání v důsledku chemoterapie proveden odběr celého jednoho vaječnicku – unilaterální ovariectomie.

Na našem pracovišti nemáme zatím vlastní zkušenost

Tab. 1. Případy kryokonzervace ovariální tkáně před gonadotoxickou léčbou (Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno, leden 2005 – leden 2011)

Pacientka	Věk kryo	Parita ženy	Onkol. diag.	Čas do chemo	Délka chemo	Body mass	Datum kryo	Kryotuby	Metoda kryo	Kryo médium
	roky			dny	měs.	kg/m <sup>2</sup>	dd.mm.rr	počet		
1	23	0	HL	5	8	24	16.12.04	1	Planer	Vitrolife
2	22	0	HL	7	8	25	08.04.05	6	Planer	Vitrolife
3	28	0	NHL	4	6	22	23.03.06	3	Planer	Vitrolife
4	33	1	NHL	8	8	26	28.03.06	4	Planer	Vitrolife
5	19	0	HL	12	8	28	27.06.06	3	Planer	Vitrolife
6	20	0	HL	5	8	24	23.08.06	4	Planer	Vitrolife
7	19	0	HL	6	8	23	29.01.07	4	Planer	Vitrolife
8	33	0	SLE	6	5	22	21.05.07	6	Planer	Vitrolife
9	29	0	AML	8	7	21	24.05.07	4	Planer	Vitrolife
10	24	0	HL	5	8	28	16.10.07	3	Vitifikace	MediCult
11	13	0	NHL	9	6	20	16.05.08	4	Vitifikace	MediCult
12	31	0	HL	11	8	21	06.02.09	4	Vitifikace	Vitrolife
13	30	0	HL	10	8	23	02.04.09	4	Vitifikace	Vitrolife
14	28	0	HL relaps	6	6	25	15.04.09	4	Planer	Vitrolife
15	34	1	ca ovarii	8	6	26	19.05.09	9*	Vitifikace	MediCult
16	31	0	ca linguae	7	5	22	07.07.09	7*	Vitifikace	Vitrolife
17	37	1	NHL	5	8	27	11.12.09	5	Vitifikace	Vitrolife
18	26	0	NHL	6	9	25	24.2.10	4	Vitifikace	MediCult
19	28	0	HL	8	5	23	21.1.11	6	Vitifikace	Vitrolife

HL – Hodgkinův lymfom, NHL – non-Hodgkinův lymfom, SLE – systémový lupus erythematodes, AML – akutní myeloidní leukémie.  
\* odběr celého jednoho ovaria (unilaterální ovariectomie)

**Tab. 2.** Výsledky kryokonzervace ovariální tkáně před gonadotoxickou léčbou (Gynekeologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno, leden 2005 – leden 2011)

Charakteristika pacientek souboru	Hodnota (jednotka)
Průměrný věk v době kryokonzervace	26,7 ± 6,2 let
Průměrná parita žen	0,2 ± 0,3
Průměrný index tělesné hmotnosti (BMI)	23,9 ± 2,4 kg/m <sup>2</sup>
Rasa pacientek	středoevropská (100 %)
Délka systémové léčby	7,1 ± 1,0 měsíců
Čas do zahájení léčby	7,2 ± 2,3 dnů
<b>Výsledky odběru a kryokonzervace ovariální tkáně</b>	<b>Hodnota</b>
Metoda odběru	laparoskopicky (100 %), délka výkonu do 60 minut, žádné operační komplikace
Množství odebraného materiálu	17x odběr ovariálního kortexu 2x jednostranná ovariectomie
Průměrný počet zamražených kryotub	4,1 ± 1,8
Použité metody kryokonzervace	10x Planner 9x Vitřifikace
Použitá kryokonzervační média	15x Vitrolife 4x MediCult
Počet případů autotransplantace	0 – ve vlastním souboru 1 – stáž Izrael (duben 2009)

s transplantací ovariální tkáně. Postup ortotopické transplantace a sledování transplantátu, uskutečněný týmem dr. Ariela Revela během pobytu autora na akademické stáži v Hadassah Medical Center v Jeruzalémě na jaře roku 2009, byl popsán v kapitole materiál a metody. Následující informace o této kazuistice jsou uveřejněny s jeho souhlasem. Šlo o 29letou nuligravidu s indexem tělesné hmotnosti 28 kg/m<sup>2</sup>. Její základní onkologická diagnóza byla alfa thalassaemia major. Jde o autozomálně recesivně dědičné onemocnění s poruchou syntézy alfa řetězce molekuly hemoglobinu: onemocnění se projevuje anémií s nemožností syntézy funkčního hemoglobinu a postupně vede ke smrti pacienta, nejčastěji na srdeční selhání. Jedinou kauzální terapií je alogenní transplantace hematopoetických buněk kostní dřeně (hematopoetic stem cell transplantation, HSCT), která může eliminovat trvalou závislost pacienta na opakovaných transfuzích. Součástí procedury je myeloablační chemoradioterapie, která téměř vždy vede k předčasnému ovariálnímu selhání v důsledku destrukce ovariálních folikulů. Pacientka podstoupila HSCT v roce 2001, ve svých 19 letech. Před léčbou jí byla provedena unilaterální ovariectomie se zamražením ovariální tkáně technikou pomalého zamrazování. Dne 24. dubna 2009 byla rozmrazena část její kryokonzervované ovariální tkáně – celkem 5 kryotub obsahujících dohromady 26 proužků ovariální tkáně velikosti asi 5 x 1 mm a tloušťce 1–2 mm. Do 1 hodiny po rozmrazení ovariální tkáně byla pacientce provedena v celkové anestezii z laparotomického přístupu autotransplantace této ovariální tkáně. Operační výkon trval celkem 70 minut. Během operace ani v průběhu pooperačního období nebyly zaznamenány žádné závažné komplikace. Laparotomie byla zcela zhojena po 7 dnech. Během časného pooperačního sledování byl již šestý pooperační den pomocí ultrazvukového dopplerovského

barevného mapování detekován zvýšený průtok krve v oblasti uložení transplantátu v ligamentum latum uteri v důsledku neovaskularizace vloženého štěpu ovariální tkáně. Ke spontánní obnově menstruačního cyklu došlo u pacientky koncem srpna 2009, tedy 4 měsíce po transplantaci. Bazální hodnoty gonadotropinů po obnovení menstruace byly následující: FSH 7,4 IU/l, LH 6,7 IU/l, estradiol (E2) 0,2 mmol/l.

## DISKUSE

Výhodou techniky KOT je její rychlost. Před odběrem ovariální tkáně není nutná ovariální stimulace gonadotropiny, což významným způsobem zkracuje dobu její realizace ve srovnání s metodami kryokonzervace oocytů či embryí. Nedochozí tak k žádnému prodloužení či odsunu zahájení vlastní onkologické léčby a nezvyšuje se riziko progresu či diseminace primárního nádorového ložiska. V našem souboru pacientek nepřesáhla doba realizace této techniky jeden týden. Doba nutná ke kryokonzervaci oocytů či embryí se běžně pohybuje mezi 3–5 týdny.

Relativní nevýhodou metody KOT může být její invazivita. Ovaria jsou na rozdíl od testes u mužů uložena intraperitoneálně v malé pánvi, tedy na poměrně obtížně přístupném místě. Odběr ovariální tkáně se provádí většinou laparoskopicky. Tato minimálně invazivní technika organismus pacientky zbytečně nezatěžuje. Celá procedura vyžaduje zpravidla jednodenní hospitalizaci. Procento komplikací je při rutinním užití této metody rovněž velmi nízké. V našem souboru pacientek jsme žádné závažné peroperační ani pooperační komplikace nezaznamenali. Rekonvalescence bývá velmi rychlá, zpravidla netrvá dále než několik dnů. Onkologickou léčbu



není nutné nějak zdržovat, celou proceduru se daří realizovat v průběhu nutných stagingových vyšetření časně po stanovení základní onkologické diagnózy. Před zákrokem je vyžadováno základní předoperační vyšetření. Zákrok je kontraindikován pouze v případě neuspokojivého zdravotního stavu pacienta, většinou na podkladě základního onkologického onemocnění.

Velmi zajímavým příkladem kombinace dvou technik reprodukční ochrany je postup navržený Revelem. Po odběru ovariální tkáně je možné nalézt ve zpracovávaném vzorku také oocyty v různých stadiích folikulogeneze [23]. Tyto oocyty je možné následně maturovat in vitro a zamrazit s využitím klasické techniky pomalého mražení nebo vitrifikace. Autoři této originální metody dokázali získat při zpracování ovariální tkáně průměrně 9 oocytů (rozptýl od 0 do 37 oocytů). Podmínkou získání dostatečného počtu oocytů je odebrání maximálně možného množství tkáně. Ve většině případů byla prováděna unilaterální ovariectomie.

Přestože většina nádorů nemetastazuje do ovaria, některé systémové druhy nádorového onemocnění, jako například leukémie, mají nezanedbatelné riziko výskytu metastáz také v ovariální tkáni. Ovariální metastázy jsou v 20–50 % popisovány také u neuroblastomu. U karcinomu prsu je riziko metastáz do ovaria nízké u klinických stadií I–III. Ovariální metastázy jsou extrémně vzácné také u lymfomů (s výjimkou Burkittova lymfomu) a většiny sarkomů (například Wilmův tumor ledviny, osteosarkom či Ewingův sarkom) [22]. Při absenci makroskopických či radiologických známek ovariálních metastáz je riziko poškození vaječniku tímto procesem velmi malé. Již během vstupního pohovoru o technice KOT je potřeba na teoretickou možnost reimplantace nádorových buněk při transplantaci pacientku upozornit. K minimalizaci tohoto rizika v našem souboru pacientek byly z každého ovaria odebrány minimálně 2 histologické vzorky ovariálního kortexu z náhodně vybraných míst, tyto vzorky byly podrobně vyšetřeny patologem na přítomnost nádorových buněk v ovariu. V žádném z vyšetřovaných vzorků v prezentovaném souboru pacientek nebyly nádorové buňky nalezeny. V případě pozitivního nálezu maligních buněk ve vyšetřovaném vzorku, je samozřejmě KOT kontraindikována a takový zorek není možné v budoucnu využít k autotransplantaci. Pacientovi je vhodné vysvětlit, že riziko rekurence základního nádorového onemocnění není možné nikdy zcela vyloučit a transplantace histologicky negativních vzorků ovariální tkáně toto riziko významným způsobem nezvyšuje. Písemný souhlas pacientky s provedením KOT i její případné transplantace vždy zaznamenáváme do zdravotní dokumentace. U pacientů s diagnózou vysoce agresivní hemato-onkologické malignity, jako je např. akutní leukémie, kde je riziko ovariálního postižení poměrně vysoké, musíme uvažovat také o jiných možnostech reprodukční ochrany. V budoucnu by problém rekurence onkologického onemocnění v důsledku transplantace ovariální tkáně mohla řešit metoda technika transplantace izolovaných primordiálních folikulů či techniky jejich maturace v podmínkách in vitro [26].

Rychlost zpracování ovariální tkáně od okamžiku

odběru do vlastní kryokonzervace má pravděpodobně vliv na počet a kvalitu uchovávaných PMF. Experimentální studie prokázaly výrazný pokles počtu primordiálních folikulů v rozmražených vzorcích ovariální tkáně v důsledku ischemického infarktu. Ve většině studií je pokles počtu primordiálních folikulů ve vzorku po autotransplantaci odhadován na 50–65 % původního počtu [3, 21]. Ovariální kortex dobře toleruje ischemii pod dobu asi 3 hodin a riziko poškození je možné snížit přidáním antioxidantů do inkubačního média (např. kyselina askorbová). Navíc bylo také prokázáno, že stromální buňky ovaria jsou významně více senzitivní k ischemickému traumatu než buňky folikulární [17].

Před použitím zamražené ovariální tkáně nutně vyvstane otázka, jak brzy po úspěšném ukončení onkologické léčby je vhodné ženě nabídnout její transplantaci. Rozhodnutí závisí zejména na prognóze základního onkologického onemocnění, zdravotním stavu ženy, negativitě výsledků restagingových vyšetření během dispenzarizace a v neposlední řadě také na názorech a přáních pacientky a jejího partnera. Stanovení období, kdy je pacient v dlouhodobé remisi onkologického onemocnění, je plně v kompetenci klinického onkologa. Na základě vlastních zkušeností doporučujeme u vyléčených onkologických pacientů před zahájením léčby metodami reprodukční medicíny vyžádat si písemný souhlas dispenzarizujícího onkologického pracoviště s navrhovaným postupem léčby neplodnosti. Mezioborová spolupráce mezi klinickým onkologem a specialistou v oboru reprodukční medicíny by tedy neměla končit při stanovení onkologické diagnózy u pacienta v reprodukčním věku, ale naopak musí pokračovat v průběhu celého jeho dalšího reprodukčního období. Převážně technickým problémem po rozhodnutí o provedení transplantace je volba neoptimálnějšího operačního postupu. Transplantační techniky se zjednodušeně dělí na dvě skupiny – ortotopické (do oblasti infundibulopelvickeho vazu v malé pánevi) a heterotopické (např. do podkoží břicha či předloktí). Po heterotopické transplantaci je oplození dozrávajících oocytů možné pouze za použití metod in vitro fertilizace. Nicméně heterotopická lokalizace má i své výhody – malou invazivitu bez nutnosti celkové anestezie, přesnější monitoring štetu nebo možnost jednoduchého odstranění v případě potřeby (např. při recidivě nádorového bujení). Ortotopická transplantace vyžaduje ve většině případů laparotomii. Při dobrých zkušenostech operátora a pracoviště je jisté možné výkon provést i laparoskopicky. Dosažení porodu zdravého dítěte se zatím podařilo pouze v případě ortotopické transplantace, proto je tato metoda i přes její větší invazivitu v klinické praxi zatím stále preferována. Pokud máme k dispozici dostatečné množství zamražené ovariální tkáně, rozmrazujeme a transplantujeme pouze její část. Tento postup je většinou možný pouze u žen, u nichž ke kryokonzervaci odebíráme a uchováváme celé jedno ovarium. Minimální množství ovariální tkáně vhodného ke transplantaci není určeno. Ze zkušeností zahraničních pracovišť se ukazuje, že k úspěšné implantaci transplantované tkáně je potřeba minimálně 15–20 proužků ovariálního kortexu.



Zajímavá je otázka délky fungování transplantátu ovariální tkáň. Dosavadní zkušenosti ze sledování pacientek, které tento zákrok podstoupily, ukazují, že funkce transplantované tkáň je časově omezená. K obnově menstruačního cyklu dochází průměrně za 4–8 měsíců od transplantace. Přestože došlo k obnově menstruace, perzistují u většiny pacientek vysoké hladiny gonadotropinů, zejména FSH. Hodnoty se běžně pohybují nad hranicí 25 IU/l. Tyto vysoké hodnoty FSH mohou být důsledkem poměrně malého počtu přeživších primordiálních folikulů v transplantátu. Po transplantaci pacient průměrně získá 500–1000 primordiálních folikulů, z nichž zhruba polovina je zničena ischemií v časném období po transplantaci [8]. Bedaivy a spol. v roce 2008 podrobněji analyzoval 23 případů úspěšné transplantace ovariální tkáň u člověka. Průměrný čas nutný k obnově funkce ovariálního štěpu byl 120 dní, s minimem 60 dní a maximem 244 dnů. Funkčnost transplantátu se odvíjí od počtu přeživších ovariálních folikulů. Studie hodnotící dobu funkčnosti transplantátu prokázaly jeho funkčnost průměrně 210 dní, tedy přibližně 7 měsíců. Minimální doba fungování štěpu byla 30 dní a maximální doba 845 dní (téměř dva a půl roku). Výsledky uvedených pozorování jsou limitovány zejména krátkým obdobím sledování funkčnosti štěpu v ojedinělých klinických případech. Délka fungování štěpu, podobně jako rychlost obnovy jeho funkce, závisí zejména na míře ischemického inzultu tkáň procesem kryokonzervace, velikosti transplantovaného vzorku a také na věku ženy [4]. Na základě těchto limitovaných pozorování je nutné každého pacienta po úspěšné transplantaci ovariální tkáň upozornit na riziko opakovaného ovariálního selhání a na pravděpodobně omezenou dobu fungování transplantátu. Právě v období fungování transplantátu je nutné v maximálně možné míře využít metod asistované reprodukce k dosažení klinického těhotenství. Pacientka a její partner by si měli být dobře vědomi tohoto faktu a vlastní proces transplantace ovariální tkáň by měl jít ruku v ruce s plánováním následné léčby metodami IVF. Transplantace ovariální tkáň je prováděna s cílem zajistit fertilitu ženy po onkologické léčbě, nemůže zatím sloužit k dlouhodobému zajištění produkce ovariálních steroidů u žen s předčasným ovariálním selháním po chemoterapii.

Důležitou otázkou pro klinickou praxi je efektivita techniky kryokonzervace ovariální tkáň z hlediska vynaložených nákladů a reálné šance pacientky na dosažení gravidity a porodu zdravého potomka. K vyhodnocení těchto dat je nutné dostatečně dlouhé časové období. Základem je pečlivý monitoring reprodukčních funkcí pacientky před zahájením léčby, v jejím průběhu a zejména v pravidelných intervalech po jejím ukončení. Tato dispenzarizace může být komplikována nezanedbatelnou mírou mortality na základní nádorové onemocnění. V případě existence více pracovišť se stejným zaměřením je velmi žádoucí vytvoření společného (národního či evropského) registru pacientů, již některé z metod reprodukční ochrany využili. Jistě nezanedbatelným aspektem

techniky KOT je jejich cena. Její výše je determinována zejména náklady na materiál a na média nutná ke zpracování odebraných biologických vzorků. Laboratoř IVF, která rutinně provádí techniku kryokonzervace embryí, je dostatečně vybavena i k realizaci techniky KOT. Na našem pracovišti byla realizace těchto technik v prvních letech projektu možná také díky grantové podpoře Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR (projekt NR8469-3/2005-2007). Po vyčerpání grantových prostředků jsme nyní nuceni po pacientce požadovat alespoň část finančních prostředků k pokrytí nákladů laboratoře. Jednání o zajištění alespoň částečné úhrady vynaložených nákladů z prostředků veřejného zdravotního pojištění zatím nebyla úspěšná. Náklady na anestezii, krátkodobý pobyt v lůžkovém zařízení a na vlastní odběr ovariální tkáň u žen pomocí laparoskopické operace jsou v současné době plně hrazeny z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Výše finančních prostředků požadovaných po pacientovi samozřejmě ovlivňuje jeho rozhodování. Část žen, u nichž je plně indikován odběr ovariální tkáň a její zamrazení pro budoucí použití, často nakonec tyto techniky nevyužijí z důvodů vysoké finanční spoluúčasti ze strany pacienta. V zahraničí je míra spoluúčasti pacienta také vysoká, nicméně je zde možnost využít komerčního pojištění či obrátit se s požadavkem na úhradu těchto technik na různé nadační instituce.

---

## ZÁVĚR

---

Léčba nádorového onemocnění má jednoznačně prioritu před šancí na zachování reprodukce. Na druhé straně tato nabídka ze strany gynekologa může významným způsobem zlepšit kvalitu života mladé onkologické pacientky. V současnosti existuje již více než 10 let klinických zkušeností s technikami kryokonzervace ovariální tkáň u člověka. Narození již desítek zdravých dětí s použitím této techniky dává šanci pacientkám do budoucna, ale stále je nutné považovat tuto techniku za experimentální. Po schválení etickou komisí příslušné instituce je tento postup eticky akceptovatelný u správně indikovaných mladých žen či adolescentek. Ve shodě s mezinárodními doporučeními zabývajícími se touto problematikou nabízíme na našem pracovišti možnost KOT všem pacientkám mladším 35 let, u nichž je významné riziko trvalého poškození funkce vaječnicku chemoterapií a není dostatek času na provedení cyklu *in vitro* fertilizace s kryokonzervací oocytů či embryí [5, 18, 25]. Písemný souhlas pacientky, popřípadě zákonných zástupců, by měl být získán po podrobné konzultaci, aby se předešlo riziku nepochopení či naopak přílišné opatrnosti. Výzkum v této oblasti je nutné nyní soustředit směrem k vývoji vhodných postupů využití ovariální tkáň po jejím rozmrazení. Budoucnost pravděpodobně leží v možnostech zajištění folikulogeneze v prostředí *in vitro*.

## LITERATURA

1. Amorim, CA., Van Langendonck, A., David, A., et al. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod*, 2009, 24, p. 92-99.
2. Anderson, RA., Weddell, A., Spoudeas, HA., et al. Do doctors discuss fertility issues before they treat young patients with cancer? *Hum Reprod*, 2008, 23, p. 2246-2251.
3. Baier, DT., Webb, R., Campbell, BK., et al. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinology*, 1999, 140, p. 462-471.
4. Bedaiwy, MA., El-Nashar, SA., El Saman, AM., et al. Reproductive outcome after transplantation of ovarian tissue: a systematic review. *Hum Reprod*, 2008, 23, p. 2709-2717.
5. Danforth, H. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril*, 2005, 83, p. 1622-1628.
6. Demeestere, I., Simon, P., Buxant, F., et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod*, 2006, 21, p. 2010-2014.
7. Demeestere, I., Simon, P., Emiliani, S., et al. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist*, 2007, 12, p. 1437-1442.
8. Donnez, J., Dolmans, MM., Demylle, D., et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004, 364, p. 1405-1410.
9. Donnez, J., Squifflet, J., Van Ryck, AS., et al. Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod Biomed Online*, 2008, 16, p. 694-704.
10. Gook, DA., Edgar, DH., Borg, J., et al. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting. *Hum Reprod*, 2005, 20, p. 72-78.
11. Hernandez-Fonseca, H., Bosch, P., Sirisathien, S., et al. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. *Fertil Steril*, 2004, 81, p. 888-892.
12. Hovatta, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10, p. 729-734.
13. Huser, M., Crha, I., Zákova, J., Ventruba, P. Proces reprodukčního státní ženy – příčiny, stanovení a možnosti užití v praxi. *Čes Gynek*, 2010, 75, p. 353-358.
14. Huser, M., Crha, I., Zákova, J., Ventruba, P. Onkofertilita – nový směr reprodukční medicíny. *Čes Gynek*, 2011, 76, p. 91-99.
15. Imhof, M., Bergmeister, H., Lipovec, M., et al. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril*, 2006, 85, p. 1208-1215.
16. Isachenko, V., Isachenko, E., Reinsberg, J., et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: effect of spontaneous and initiated ice formation. *Reprod Biomed Online*, 2008, 16, p. 336-345.
17. Kim, SS., Yang, HW., Kang, HG., et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril*, 2004, 82, p. 679-685.
18. Lee, SJ., Schovej, LR., Partridge, AH., et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*, 2006, 24, p. 2917-2931.
19. Meirov, D., Levron, J., Eldar-Geva, T., et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*, 2005, 353, p. 318-321.
20. Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*, 1996, 11, p. 1487-1491.
21. Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Qu, J., et al. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril*, 2000, 74, p. 122-129.
22. Oktay, K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update*, 2001, 7, p. 526-534.
23. Revel, A., Revel-Vilk, S., Aizenman, E., et al. At what age can human oocytes be obtained? *Fertil Steril*, 2009, 92, p. 458-463.
24. Silber, SJ., DeRosa, M., Pineda, J., et al. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod*, 2008, 23, p. 1531-1537.
25. Wallace, WH., Anderson, RA., Irvine, DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol*, 2005, 6, p. 209-218.
26. Xu, M., Barrett, SL., West-Farrell, E., et al. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod*, 2009, 24, p. 2531-2540.

*Doc. MUDr. Martin Huser, Ph.D.  
Gynekologicko-porodnická klinika  
LF MU a FN Brno  
Jihlavská 20  
602 00 Brno*



## 4. HODNOCENÍ KVALITY GAMET A EMBRYÍ

S počátkem nového tisíciletí, vyvstaly nové požadavky jak na klinickou, tak na laboratorní část asistované reprodukce v souvislosti jednak se stále stárnoucí populací pacientů a jednak s naléhavější snahou eliminovat výskyt vícečetných těhotenství.

Lemos a spol. v americké studii z roku 2013 [50] uvádí, že cena porodu dvojčat je 5x vyšší, než u jednoho dítěte, zatímco u trojčat je téměř 20x vyšší. Celkové náklady na zdravotní péči jsou okolo 21 000 dolarů na porod jednoho dítěte, 105 000 dolarů na dvojčata a okolo 400 000 dolarů na trojčata a víceročata. Studie, která hodnotila náklady na zdravotní péči o matku v průběhu 27 týdnů před porodem až do 30 dní po porodu, také brala v úvahu náklady na zdravotní péči o kojence až do jeho prvních narozenin. Jednalo se o skupinu žen ve věku 19 až 45 roků, které porodily nejméně jedno živé dítě v letech 2005 až 2010 a týkala se téměř 440 000 porodů. Z těchto porodů bylo okolo 97,0 % jednočetných, 2,8 % dvojčat a 0,13 % trojčat a vícečetných těhotenství.

Tato fakta znamenají pro embryology nové výzvy a nová řešení. Narůstá snaha najít způsoby výběru jednoho nejkvalitnějšího embrya na transfer. Kvalita a vitalita embrya vychází největší měrou, pomineme-li kultivační podmínky, z kvality gamet. Naskytl se nám tedy úkol, jak vybrat kvalitní oocyty a spermie a jak poznat ta nejlepší životaschopná embrya. Některé metody jsme aplikovali do praxe.

### 4.1. Hodnocení kvality oocytů a spermii

#### Kvalita oocytů

Kvalitu oocytů hodnotíme poprvé hned při jejich vyhledávání ní z folikulární tekutiny, nepřímo **hodnocením morfologie celého komplexu oocyt – cumulus oophorus**, pod vyhledávacím mikroskopem (obr. 29).

Posuzování provádíme následovně: **Typ 1**- buňky kumulu jsou velké, rovnoměrně rozprostřené kolem oocytu s velkým množstvím extracelulární matrix. Corona radiata se jeví buď jako velmi expandovaná a světlá, nebo kompaktní, méně světlá. Oocyt má vyvinuté první pólové tělíčko, které však často nemusí být přístupné pozorování. Komplex oocyt-cumulus oophorus tohoto typu je vhodný k oplození po preinkubaci po dobu 2 - 6 hodin.

**Typ 2** - buňky kumulu mají průměrnou velikost, jsou v kumulu rovnoměrně rozptýleny. Corona radiata se jeví jako denzní a ostře ohraničená. Oocyt nemá vyvinuté pólóvé tělísko. Preinkubační doba pro tento typ je 6 - 12 hodin.

**Typ 3** - kumulus a korona obklopující zonu pellucidu sestávají z hustě nahloučených buněk. Oocyt nemá pólóvé tělísko. Vhodná preinkubační perioda je 12 - 24 hodin.

**Typ 4** - kumulus s korunou je malý, tvořený pouze několika málo vrstvami buněk. Oocyt nemá vyvinuté pólóvé tělísko, v oocytu je zpravidla patrný zárodečný měchýřek (jádro). Preinkubační perioda je 24 - 36 hodin. Takové oocyty by měly být z oplozování vyloučeny. Reálnější představu o stavu a zralosti oocytu získáme, když jej enzymaticky a mechanicky zbavíme buněk cumulus oophorus a corona radiata a **hodnotíme samotný oocyt** před oplozováním metodou ICSI. Tehdy je dobře patrné, zda jsou již v optimální fázi pro oplozování - v metafázi II, nebo naopak ještě ve stádiu zárodečného váčku. Van Blerkom [8] uvádí, že 13 % neoplozených oocytů po IVF v případě normálního spermogramu, vykazovalo morfologické abnormality.

**Oocyt v metafázi II** je definován jako oocyt s jasnou, jemně zrnitou cytoplazmou, malým perivitellinním prostorem a s jasnou, bezbarvou zónou pellucida (obr. 30). Často pozorujeme abnormality v barvě, granularitě a homogenitě cytoplasmy, cytoplasmatických inkorporacích a extracytoplasmatických abnormalitách jako velikost perivitellinního prostoru, barva zóna pellucida a tvar oocytu. Dále lze hodnotit přítomnost pólóvého tělíska, jeho tvar, případně fragmentaci. Oocytů je však omezený počet a mnohdy nelze příliš vybírat ty, které se budou oplozovat.



Obr. 29: Komplex oocyt–cumulus oophorus  
zvětšení: 40 x



Obr. 30: Oocyt v metafázi II, zvětšení: 350 x

## Kvalita spermií

Spermie má významný podíl na správném oplození oocyty a jeho dalším vývoji. Přináší přibližně polovinu vloh, které vytváří genom nového jedince. Úloha spermie byla mnoho let zjednodušována na pouhý transport DNA do oocyty. Bylo však spolehlivě prokázáno, že se významně podílí na abnormálním vývoji embrya a selhání implantace [6].

a) **Konvenční analýza spermatu, stanovení spermiogramu**, zůstává zlatým standardem při zahájení vyšetření mužské infertility. Ve snaze zajištění určitého standardu a srovnatelnosti výsledků postupujeme dle „WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen“ [117]. Vydala ho WHO v roce 1987 a od té doby prošel několika aktualizacemi v letech 1992, 1999 a naposled v roce 2010, kdy vyšla jeho 5. edice (tab. 7).

Spermiogram je vyšetření, kdy zjišťujeme objem ejakulátu, pH, barvu, viskozitu, koncentraci spermií v něm (v mil/ml), jejich motilitu a charakter pohybu (progresivní, neprogresivní, nepohyblivé), morfologii, tzn. patologie hlavičky, krčku a bičíku a další parametry. Vyšetření se provádí v Maklerově komůrce (obr. 31).



Obr. 31: Maklerova komůrka k hodnocení spermiogramu

Analýza spermatu má však limitovanou výpověď o šanci páru na těhotenství metodami AR, neboť snížená fertilita může mít mnoho příčin. Existuje řada přístupů k hodnocení ejakulátu, avšak žádný z nich neodhalí přesně míru plodnosti.



**Tab. 7: Hodnoty základních parametrů při hodnocení spermiogramu dle WHO platné jako norma (4. a 5. edice manuálu)**

WHO manuál	Edice 4 od r. 1999	Edice 5 od r. 2010
Objem ejakulátu (ml)	2	1,5
Celkový počet spermií (x 10 <sup>6</sup> /ejakulát)	40	39
Koncentrace spermií (x 10 <sup>6</sup> /na ml)	20	15
Celková pohyblivost (%)	50	40
Progresivní pohyblivost (%)	25	32
Morfologicky normálních (%)	30	4

Úspěšnost metody ICSI snížila význam a potřebu provádět testy kvality spermie, když dokonce morfologicky abnormální a imotilní spermie mohou vést k úspěchu ve 25 %. Byly vyvinuty různé funkční testy, avšak v nejsou příliš praktikovány.

Klasické rutinní techniky úpravy spermatu využívané v embryologických laboratořích jsou density gradient centrifugation a swim-up. Na základě migrace nebo sedimentace se získávají spermie s lepší motilitou a morfologií.

**Morfologie a motilita neidentifikuje ovšem další charakteristiky**, jako jsou chromozomální aberace, defekty chromatinu a DNA. Znamená to tedy, že z hlediska optimálního fertilizačního potenciálu takto připravené spermie k inseminaci selektovány nejsou. U klasické IVF funguje zona pellucida jako selektivní biologická bariéra proti abnormálním spermiím, takže ve většině případů jsou schopné oplodnit vajíčko jen „normální“ spermie. U metody ICSI se tento mechanismus „přirozeného“ výběru obchází a o výběru spermií rozhoduje morfologické posouzení embryologa.

Je nutné využít další technické možnosti k vyšetření kvality spermií, které se nabízejí a začlenit je do každodenního použití v embryologické laboratoři [18].

### **b) Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection (IMSI)**

Výběr kvalitnější spermie lze zvýšit mikroskopickou technikou „Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection“ (Intracytoplasmatická injekce spermie selektovaná morfologicky) (IMSI). Jedná se o metoda výběru spermie pro ICSI, přímo v reálném čase při velkém zvětšení pod mikroskopem. Metoda byla vyvinuta skupinou Bartoova v Izraeli [7]. K důkladnému morfologickému výběru spermie (bez abnormalit hlavičky, s normálním tvarem jádra a bez vakuol v hlavičce) pro injekci do vajíčka je používáno velké mikroskopické zvětšení (6000x – 8000x). Běžné oplodnění vajíček pomocí metody ICSI je prováděno při relativně malém zvětšení (200x – 400x) umožňujícím výběr spermie, která je pohyblivá a na první pohled morfologicky v pořádku. IMSI je technologicky náročná metoda, která výrazně prodlužuje čas celého výkonu (až na 5 hodin) a vyžaduje nakladné přístrojové vybavení. Tuto techniku jsme na našem pracovišti neprováděli, je zmíněna pouze k výčtu metod hodnocení kvality spermie.

### **c) Hodnocení integrity chromatinu spermií**

Kvalitu genetické informace v hlavičce spermie nelze účinně ovlivnit. DNA může být porušena zlomy nebo kovalentní modifikací nukleotidů, tzv. DNA addukty. Oba tyto typy poruch jsou jednou z příčin infertility. V mnoha případech je vyšetření poruchy DNA významným předpovědním ukazatelem úspěchu. Například muži s fragmentací DNA spermií nad hranici 25 % za použití Comet assay nebo 30 % při použití SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) mají vyšší riziko infertility [88]. Zdá se, že vyšetřování poškození DNA spermií se dá považovat za nový důvěryhodný biomarker mužské infertility. Poškození DNA spermie je spojeno s delším časem potřebným k otěhotnění než u fertálních párů, může zapříčinit selhání fertilizace, může se odrazit ve zhoršené morfologii embryí, s dopadem na dělení embryí, formaci blastocyst, snížením implantace po IVF a také s vyšším rizikem těhotenských ztrát jak po IVF, tak po ICSI.

Poškozená DNA spermie může být inkorporována do embryonálního genomu a tak vést k chybám v DNA replikaci, transkripci a translaci v průběhu embryogeneze a může tím přispět k nemocem v příštích generacích [4].

Existuje celá řada metod, které umožňují kvantifikovat poškození chromatinu.

**Testy ke zjišťování poruch chromatinu** jsou například kometový test - COMET assay, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), Terminal transferase dUTP Nick End Labelling assay

(TUNEL) nebo Sperm Chromatin Dispersion test (SCD test) či Halo test. Limitací těchto testů je, že testované spermie nejsou vhodné ke klinickému použití.

Metodou FISH lze vyšetřit u spermií rovněž strukturální chromozomální abnormality.

Ve snaze obejít tento problém jsou vyvíjeny další testy, které by pomohly embryologům vybrat spermii s malým DNA poškozením pro ART.

#### **d) Selektce zralých spermií**

U zralých spermií byl prokázán výrazně nižší výskyt chromozomálních anomálií (viabilní, bez retence cytoplasmy, nižší fragmentace DNA). Byla tedy vyvíjena řada metod s cílem získat zralé, strukturálně intaktní spermie s vysokou integritou DNA. Mezi tyto metody patří např. selekční metody založené na elektrických a magnetických vlastnostech spermie [26, 80], metody založené na apoptóze spermií, metody založené na ultramorfolonii spermie (IMSI) a také selekční metody založené na zralosti membrány spermie (PICSI) [38].

#### **Preselektovaná spermie pro intracytoplazmatickou injekci (PICSI)**

Analýza spermatu pro oplození oocytů neposkytuje další informace o spermiích, např. jaká je zralost jádra, integrita chromatinu či schopnost vazby spermie na oocyt. Sperma s dobrou koncentrací a pohyblivostí spermií nezaručuje oplození oocyty a zdárný vývoj embrya. Nehledě k faktu, že při in vitro fertilizaci je třeba oplozovat oocyty takovým spermatem, který je k dispozici a který velmi často nesplňuje ani hranici normy. Při obvyklých postupech ICSI jsou spermie pro injekci selektovány embryologem ve světelném mikroskopu vizuálně na základě jejich morfologie a pohyblivosti.

Metoda PICSI dovoluje výběr spermie rozšířit o jeden další důležitý kvalitativní paramet, a to zralost resp. lepší genetickou výbavu (zralé spermie mají výrazně nižší výskyt chromozomálních aberací). Selektce zralých spermií je založena na základě jejich schopnosti vázat se k hyaluronanovému hydrogelu, neboť pouze hlavička zralé spermie nese receptor, který tuto vazbu umožňuje [37]. Kyselina hyaluronová je hlavní komponentou cumulus oophorus - vrstvy buněk obklopující oocyt. Chemicky se jedná o polypeptid tvořený z opakujících se jednotek N-acetylglukozaminu a kyseliny glukuronové. Při oplození je z akrozomu spermie uvolňován mimo jiné enzym hyaluronidáza, který rozrušuje spoje buněk corona radiata a umožňuje vazbu spermie k zona pellucida. Bylo prokázáno, že spermie selektované touto



technikou jsou viabilní, bez retence cytoplasmy, mají nižší fragmentaci DNA a nižší markery apoptózy [41].

Metodu PICSI popisuje a hodnotí naše **Publikace XXI**.

### **Materiál a metodika:**

Metodu PICSI jsme zavedli ve druhé polovině roku 2010. V úvodním 4 měsíčním souboru jsme provedli pomocí PICSI oplození oocytů 40 pacientkám.

K výběru spermií je třeba speciální misky pro PICSI (PICSI® Sperm Selection Device MidAtlantic Diagnostics, Inc.), což je polystyrenová kultivační miska se třemi mikrokapkami hyaluronanu přichycenými na vnitřní stranu dna misky (obr. 32). Kapky jsou pro zviditelnění označeny šipkami na vnější straně dna misky. Hyaluronové mikrokapky je třeba před přidáním spermií nejdříve hydratovat médiem, což způsobí nabobtnání gelu a umožní vazbu spermií. Zralé spermií rozpoznají strukturu hyaluronanu a navážou se na něj (obr. 33). V mikroskopu je poznáme tak, že při intenzivním pohybu bičíku nevykazují progresivní pohyb. Pomocí mikromanipulační pipety jsou následně tyto spermií nasáty, přeneseny do samostatné kapky média použité k injekčnímu vpravení do cytoplazmy metodou ICSI [130].



Obr. 32: Miska pro PICSI



Obr. 33: Spermie navázané na hyaluronan

### **Výsledky:**

1. V období **zavádění metody** (od července do konce října **2010**) jsme pomocí PICSI oplozovali 152 MII oocytů od 40 pacientek. Ve 34 případech (85,0 %) byl spermigram pod hranicí normy buď ve všech, nebo alespoň jednom parametru - koncentrace spermií (mil/ml), procento pohyblivých spermií, morfologie.
2. Oplozeno bylo 142 oocytů (fertilization rate 93,4 %) oproti dlouhodobému průměru 89,2 %

při ICSI bez selekce.

3. Transfer embryí byl proveden u 38 pacientek, přičemž u 21 z nich bylo dosaženo těhotenství, což bylo **55,3 % PR**. U standardní metody ICSI bylo v tomto období dosahováno PR 38,2 %.
4. Od konce roku 2010 je PICSÍ zavedenou a rutinně prováděnou metodou v naší laboratoři.
5. Ze souboru 1090 pacientek, u kterých jsme prováděli oplozování intracytoplazmatickou injekcí, si 779 pacientek přálo provést výběr zralých spermií. Znamená to, že v 71,5 % volili pacienti ten nejkvalitnější výběr spermií, který v současných podmínkách v klinické praxi poskytujeme.

#### **Závěr:**

PICSÍ je perspektivní metodou pro zlepšení výsledků ICSI. Lze ji doporučit v případě nízkého počtu oplozených oocytů, nedostatečného vývoje embryí v předchozích výkonech a v případě opakovaných těhotenských ztrát. Očekávaná výhoda PICSÍ spočívá v tom, že u spermií selektovaných pomocí hyaluronanu je frekvence chromozomálních disomií a diploidií v normálním rozmezí, a to nezávisle na frekvenci aneuploidií v počátečním spermatu.

#### **e) Proteom seminální plazmy**

Seminální plazma je důležitou složkou spermatu, která vytváří „životní prostředí“ pro spermie. Obsahuje mnoho proteinů, jejichž zdrojem je varle, nadvarle a přídatné žlázy. Vyskytují se v něm mimo jiné i proteiny, které jsou důležitými markery patologií reprodukčního ústrojí. Patologie spermatu jsou spojeny s rozdílnou expresí proteinů přítomných v seminální plazmě.

Technologie dvourozměrné gelové elektroforézy kombinovaná s identifikačními možnostmi spektrometrie byla úspěšně aplikována na komplexní proteom spermatu [65].

Cílem naší práce bylo pomocí stejné metody analyzovat, zda jsou nějaké rozdíly v proteomu seminální plazmy mužů s azospermií a dárců spermatu s normospermií.

Tématu proteomu seminální plazmy se věnujeme v **Publikaci XXII**.

#### **Materiál a metodika:**

Vzorky seminální plazmy byly získány po centrifugaci ejakulátu (2790g, 10 minut) od 6 mužů s normálním spermioqramem a 6 mužů s azospermií. Supernatanty byly staženy do kryozkumavek a zamrazeny. K vyšetření byly transportovány do Centrální laboratoře Oddělení funkční genomiky a proteomiky Přírodovědecké fakulty MU v Brně.

Proteiny ve vzorcích byly solubilizovány a výsledné proteinové izoláty byly separovány dvourozměrnou gelovou elektroforézou. Kvalitativní a kvantitativní rozdíly byly vyhodnoceny programem PDQuest a Mascot [17].

### **Výsledky:**

1. Vyšetření byla provedena na vzorcích od 6 normospermiků a 6 mužů s azoospermií.
2. Mezi oběma skupinami byly zjištěny četné kvalitativní i kvantitativní rozdíly. Na základě výsledků analýzy obrazu bylo pomocí hmotnostní spektrometrie identifikováno osmnáct kvalitativně odlišných proteinů.

### **Závěr:**

Bylo nalezeno 18 kandidátních proteinů, které mohou být potenciální markery azoospermie. Vyšetření seminální plazmy přináší nové možnosti poznání patologie spermatu. Dalším důležitým krokem pro klinické využití bude stanovení funkce jednotlivých proteinů a jejich podílu na snížení plodnosti.

## **4.2. Hodnocení kvality embryí**

Kvalita embryí a jejich výběr pro embryotransfer jsou od samých počátků prováděny na základě morfologických znaků pomocí klasické mikroskopie. Nicméně pravděpodobnost uchycení takto vybraných embryí po implantaci do dělohy a následného rozvinutí těhotenství obecně nepřesahuje 35 %. Proto jsou hledány nové metody, které by nám o embryu a jeho životaschopnosti poskytly další údaje. Jak následně určit po všech stránkách kompetentní embryo pro transfer, k tomu slouží sofistikované a objektivní hodnocení přednostně neinvazivními metodami.

### **a) Biomarkery metabolismu embryí**

V současné době jsou k dispozici vysoce citlivé analytické techniky umožňující přesnou detekci molekul, které souvisí s metabolismem embrya v prvních dnech jeho vývoje. Jednotlivé metabolity jsou výsledkem všech předchozích regulačních procesů na úrovni genomu a proteomu a proto dávají cennou informaci o výsledné reakci. V uplynulých letech byl analyzován metabolismus embryí kultivovaných in vitro a hodnocen jejich vztah k morfologii a dosažení těhotenství. Pozornost byla soustředěna nejčastěji na **metabolismus aminokyselin,**



**glukózy a pyruvátu.** Aminokyseliny jsou základními stavebními jednotkami proteinů a jako takové jsou součástí kultivačních médií. Změny hladin aminokyselin odráží metabolické funkce dělicích se buněk [11]. Glukóza a pyruvát patří k základním látkám, ze kterých embryo získává energii. V časných stádiích vývoje je hlavním zdrojem energie pyruvát a laktát. Schopnost metabolizovat glukózu se zvyšuje při přechodu ze stádia moruly do blastocysty. Spolehlivé stanovení metabolitů biologických systémů vyžaduje adekvátní metody analýzy.

K stanovení změn složení kultivačních médií lze využít široké spektrum analytických technik, jako jsou kapilární elektroforéza, plynová a kapalinová chromatografie, ve spojení s detektory pracujícími na různých fyzikálních principech. K nejčastěji využívaným metodám patří **hmotnostní spektrometrie** (MS – mass spectrometry [44], kapilární elektroforéza v kombinaci s MS, kapalinová chromatografie v kombinaci s MS a plynová chromatografie s MS [22].

Zajímavou alternativou pro metabolomické studie je **kombinace kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí** (CCD - contactless conductivity detection) [66]. Naše centrum AR spolupracuje s výzkumnou **skupinou Metabolomika z CEITEC Brno**, která se v současnosti zaměřuje na využití CCD pro analýzu použitých kultivačních médií v asistované reprodukci. Výsledky by mohly poskytovat informace o metabolické aktivitě embrya a podpořit tak výběr embrya s nejvyšším implantačním potenciálem.

Cílem vývoje je vytvoření metody, která by mohla být rutinně používána v embryologických laboratořích. První klinické studie neinvazivního stanovení metabolomu média po kultivaci embryí prokázaly korelaci mezi zjištěným profilem a dosažením klinického těhotenství. Pro analýzu byla nejčastěji využita metoda NIR [111]. Při analýzách metabolismu pyruvátu bylo prokázáno, že zvýšený příjem pyruvátu embryem koreluje s jeho vývojem do stadia blastocysty [10]. V multicentrických studiích bylo také prokázáno, že metabolický profil kultivačního média embrya je nezávislý na morfologii a v kombinaci s morfologickým hodnocením embrya umožňuje výběr embryí s vyšším implantačním potenciálem [85].

Ve spolupráci s Ústavem biochemie Přírodovědecké fakulty MU a CEITEC v Brně jsme se snažili v roce 2011 učinit první kroky ke sledování metabolomu embryí. Byla zvolena metoda kapilární elektroforézy, která je vhodný analytický nástroj pro sledování bilancí koncentrací důležitých složek kultivačního média, jako jsou aminokyseliny a karboxylové kyseliny. Analyzovali jsme 6 vzorků kultivačního média G-1™ (Vitrolife, Švédsko) od embryí po 96ti

hodinách kultivace ve vývojovém stádiu morula. Z výsledků jsme nedošli ke globálním závěrům [53].

#### **b) Hodnocení morfologie embryí**

Technologie neinvazivního hodnocení lidských embryí in vitro však nejsou stále ještě všeobecně dostupné. Techniky nejsou v klinické laboratorní praxi snadno a rychle aplikovatelné nebo analytické přístroje pro rutinní využívání nejsou dostupné. Většina embryologických laboratoří na celém světě proto stále ještě hlavní mírou vybírá embrya pro transfer na základě hodnocení jejich morfologie a vývojového potenciálu pomocí světelné mikroskopie.

Protože jsou v systému hodnocení embryí a sledovaných parametrech velké rozdíly nejen v různých zemích, ale i mezi laboratořemi v rámci jedné země, sešli se zástupci mezinárodních společností **Alpha Scientists in Reproductive Medicine a ESHRE Special Interest Group Embryology v roce 2011 v Istanbulu a zpracovali konsensus**, který reprezentuje „**minimální standard**“ pro skórování oocytů a embryí [1]. Doporučují používat toto společné minimum popisného skórovacího systému pro všechny laboratoře s tím, že zvláště vhodné a přínosné to bude v případě publikací s mezinárodním významem, aby se zvýšilo využití poznatků pro každodenní praxi v kterékoliv laboratoři světa. „Timing“ sledování vývoje embrya je uveden v tabulce 8.

**Optimální morfologie oocytu:** sférická struktura obalena zona pellucida, průsvitná cytoplazma bez inkluzí, vyčleněné pólové tělísko. Oocyt s abnormálně velkým pólovým tělískem by neměl být oplozován, neboť je pravděpodobné riziko aneuploidie oocytu.

Velké vakuoly ( $\geq 14 \mu\text{m}$  v průměru) obvykle vedou k selhání fertilizace.

Optimálně **fertilizovaný oocyt:** sférický, má dvě pólová tělíska se dvěma centrálně umístěnými, stejně velkými prvojádry. Prvojádra by měla mít stejný počet a velikost jadérek. Prvojádra jsou hodnocena jako symetrická, nesymetrická a abnormální (obr. 34).

**Dělicí se embrya:** dle „Consensu“ embrya, která se dělí rychleji nebo později než je očekávaný interval, mají redukovaný implantační potenciál. Fragmentace je u dělicích se embryí definována jako střední ( $\leq 10 \%$ ), přiměřená ( $10 - 25 \%$ ) a těžká ( $\geq 25 \%$ ). Multinukleace (přítomnost více než 1 jádra v blastomeře) souvisí se sníženým implantačním potenciálem

embrya. Stejná velikost blastomer je důležitá od 2 do 8 buněčného stádia. Ve všech dalších stádiích je nepravidelnost blastomer spojena s různou fází dělení. Další morfologické znaky, které se hodnotí jsou granulace cytoplazmy, vzhled membrán, přítomnost vakuol. Důležité je trojrozměné rozvrstvení buněk v embryu.

**Tab. 8 : „Timing“ sledování fertilizovaného oocyty a optimálního embryálního vývoje dle Istanbulského konsensu**

Typ hodnocení	Čas po inseminaci (hod)	Očekávané vývojové stádium
kontrola fertilizace	17 ± 1	stádium prvojader (PN)
kontrola syngamie	23 ± 1	50 % - stádium syngamie více než 20 % - 2 buněčné
časné rýhování	26 ± 1 po ICSI 28 ± 1 po IVF	2 buněčné stádium
embryo den 2 (Day-2)	44 ± 1	4 buněčné stádium
embryo den 3 (Day-3)	68 ± 1	8 buněčné stádium
embryo den 4 (Day-4)	92 ± 2	morula
embryo den 5 (Day-5)	116 ± 2	blastocysta



Obr. 34: Oplozený oocyt ve stádiu zygoty s prvojádry, v jádrech jsou patrna jádérka, zvětšení 300 x



**Morula:** Optimálně by dělicí se embryo mělo být v době  $92 \pm 2$  hodiny ve stádiu moruly. Mělo by být kompakující nebo kompakované po celém povrchu. Horší prognózu mají moruly s některými (2 až 3) buňkami vyloučenými mimo povrch.

**Blastocysta:** Optimálně by měla být úplně expandovaná s prominující ICM s rozpoznatelnými buňkami k sobě těsně přiléhajícími a s trofektodermem, který je tvořený množstvím buněk, které formují kompaktní epitelium.

Hodnocení embryí v naší laboratoři provádíme za 16 až 18 hodin po oplození, kdy u zygot sledujeme přítomnost a symetrii prvojader, rozložení a počet jadérek a pozice pólových tělísek. U dělicího se embrya hodnotíme počet blastomer v závislosti na dni kultivace, souměrnost blastomer, přítomnost fragmentů, případně multinukeace blastomer, počet jader a vakuoly.

U moruly hodnotíme stupeň její kompaktace.

U blastocysty hodnotíme její expanzi, vzhled ICM, blastocoel a buňky trofektodermu.

Klasické hodnocení provádíme 1x denně ve světelném mikroskopu.

Přestože tyto tradiční systémy hodnocení morfologie zárodečných buněk a embryí dosáhly již svého limitu při výběru optimálního embrya pro transfer, zůstávají pro embryology stále užitečným nástrojem. Pro pokrok v této oblasti je však žádoucí a nezbytné, abychom dostávali stále více informací a hlavně přesnějších informací nejen o morfologické kvalitě, ale i o fyziologické aktivitě jednotlivých embryí.

### **c) Preimplantační genetická diagnostika (PGD) a preimplantační genetický screening (PGS)**

K vitalitě embrya přispívá jeho správná genetická výbava, avšak bez biopsií a vyšetření blastomer pomocí metod PGD nebo PGS nejsme schopni genetické abnormality zjistit. PGD, která byla poprvé ve světě provedena v roce 1989 [32] umožňuje objevit jak poruchy v počtu, tak stavbě chromozomů a také genové mutace. To znamená změny ve stavbě genetické informace, které by mohly vyvolat vznik vrozené vady. Je možno zjišťovat jak genetické vady, které očekáváme, tak i vady náhodně vzniklé při vývoji vajíček a spermií. Indikací k PGD jsou např. vrozené chromozomální aberace u některého z rodičů, vyšší věk ženy, nebo obou rodičů, porod

dítěte s vrozenou vývojovou vadou v rodině, opakované spontánní potraty nejasné etiologie, závažný andrologický faktor atd.

Pomocí PGD je možno vyšetřit aneuploidii embryí (metodou FISH), nebalancované translokace embryí (FISH) a monogenně dědičné choroby (PCR). V současné době se nejčastěji využívá metoda array CGH, která pracuje na principu mikročipové technologie (tzv. microarray). Hlavní změnou oproti starším postupům je mnohonásobně vyšší přesnost při záchytu dědičných onemocnění a možnost vyšetřit všechny chromozomy embrya. Metoda FISH dovoluje analýzu omezeného počtu chromozomů, nejčastěji 7 až 9. Munné et al. uvádí, že při vyšetření 10 až 12 chromozomů, se přesnost FISH zvyšuje na 89 až 91 % aneuploidií [63].

Metody PGD a PGS mají své nezastupitelné místo v indikovaných případech. Selekcí a transferem embrya, v jehož blastomeře nebyla prokázána aneuploidie chromozomů, se výrazně zlepšily výsledky léčby.

V závěrech meta-analýzy randomizovaných studií v roce 2011 uvádí autoři, že v současné době neexistuje důkaz o přínosu PGS pro zvýšení počtu živě narozených dětí po IVF a u žen vyššího věku PGS signifikantně počet živě narozených dětí snižuje [56]. Příčinou je především mozaicismus jednotlivých blastomer. Z těchto důvodů rutinní provádění PGS ve všech IVF cyklech nedoporučuje ani „ESHRE PGD Consortium“ ve svém rozboru desetiletého sběru dat [33].

Na našem pracovišti provádíme PGD od roku 2000 a PGS od roku 2012. V roce **2001** jsme dosáhli narození **prvního dítěte po PGD**. V letech 2000 až 2013 jsme provedli u 139 pacientek odběr blastomer pro genetické vyšetření metodami FISH, PCR a aCGH. U 88 pacientek bylo po genetickém vyšetření alespoň jedno embryo vhodné k transferu. Dosáhli jsme 29 klinických těhotenství, což je 32,9 % PR.

Alternativou velmi nákladné PGS by mohl být neinvazivní monitoring embryonálního vývoje s predikcí výskytu chromozomálních anomálií [34].

#### **4.2.1. Kontinuální monitoring vývoje embryí**

Ve snaze vybrat co nejkvalitnější embryo na transfer provádíme v průběhu kultivace každodenní hodnocení jeho vývoje. Klasický způsob hodnocení embryí používaný běžně v laboratořích se provádí jednou denně pod mikroskopem, kdy embrya opouští na několik minut

konstantní prostředí kultivačního boxu. Tradiční morfologické hodnocení bylo doplněno kontinuálním sledováním vývoje embryí zavedením time-lapse systému [77].

Pravidelnost a rychlost dělení embrya úzce souvisí s jeho správnou životaschopností a dosažením těhotenství. Pravidelné dělení buněk je projevem správného počtu chromozómů a genetické informace v nich obsažené. Odhalení poruch dělení buněk embrya, které je možné právě díky průběžným záznamům, umožňuje vyřadit a netransferovat embrya s výskytem chromozomálních abnormalit, které by mohly vést k časným potratům.

Indikací k monitorování jsou hodnoty spermioqramu na spodní hranici normy, nízká fertilizace po ICSI, nepříznivý vývoj embryí v předchozích cyklech, opakované potraty v anamnéze léčeného páru, vyšší věk ženy.

V současné době je nejvíce používán **systém Primo Vision** (Vitrolife, Švédsko), nebo Embryoscope (Unisense Fertilitech Dánsko), velmi sofistikovaný monitorovací přístroj obsahující inkubátor, mikroskop a počítač.

Retrospektivní analýza dat ukazuje, že kultivace a výběr embryí po **time lapse monitoringu** signifikantně zvyšuje pravděpodobnost klinického těhotenství. (+15,7 % na embryotransfer) [59]. Ke zvýšení PR přispěla dvě pozitiva tohoto systému, a to kombinace stabilních kultivačních podmínek a užití morfokinetických parametrů k selekci embrya [75].

Multicentrická retrospektivní analýza [80] zjistila limitovanou implantaci těch embryí, která vykazovala v době první mitózy rozdělení z 1 na 3. Takové pozorování může být uděláno pouze při time lapse. Při statickém hodnocení by nepravidelnost dělení nemohla být zachycena.

V roce 2011 jsme zavedli **kontinuální hodnocení vývoje embryí pomocí zařízení Primo Vision System** (Cryo-Innovation Technologies, Hungary, nyní Vitrolife Švédsko), jak uvádíme v **Publikaci XXVI**.

#### **Materiál a metodika:**

Systém sestává z kompaktního digitálního inverzního mikroskopu s kamerou umístěného v uzavřeném inkubátoru a z řídicí počítačové jednotky a monitoru (obr. 35, 36). Kamera každých 15 minut pořizuje 5 sekundový záznam. K řídicí počítačové jednotce může být připojeno až 6 sběrných kamer a mohou se tak monitorovat embrya od šesti pacientek. Analýza morfologie a dynamiky vývoje se provádí z časosběrného digitálního záznamu na monitoru.



Embrya jsou pro toto sledování umístěna na speciální WOW misce v kultivačním médiu pod minerálním olejem v 9 nebo 16 samostatných jamkách. Jedna miska je určena vždy pro jednu pacientku.

### **Výsledky:**

1. V zaváděcím období od března do června 2011 jsme měli možnost se seznámit se zařízením Primo Vision Systém, který jsme měli zapůjčený a s technikou odečítání a vyhodnocovaných časosběrných záznamů. V tomto období jsme monitorovali vývoj embryí u 22 pacientek a k transferu vybírali embrya s pravidelným dělením a odpovídající dynamikou vývoje. Dosáhli jsme **9 těhotenství, což činilo 40,9 % PR.**
2. Výsledky nás vedly k rozhodnutí zakoupit vlastní Primo Vision systém, který byl postupně zdokonalován a bylo na něm provedeno up grade na 3D rozlišení.
3. Od června 2011 do konce roku 2013 jsme provedli kontinuální záznam vývoje embryí u 133 pacientek. V případě 4 pacientek nebylo žádné embryo dle hodnotících kritérií vhodné k transferu. Bylo dosaženo **51 těhotenství, což představuje 39,5 % PR** (tab. 9).
4. Provedli jsme analýzu vývoje kultivovaných embryí v závislosti na jejich dosažené kvalitě před transferem a určili jsme si limitní časové hranice, do kterých by se mělo embryo v určitou dobu kultivace vejít, aby mohlo být označeno za embryo s dobrou šancí a bylo přednostně vybráno pro embryotransfer:
  - optimální interval od provedení ICSI do stádia 2 buněk: 20 až 26 hodin
  - optimální interval od stádia 2 buněk do 4 buněk: 10 až 13 hodin
  - optimální interval od stádia 4 buněk do 8 buněk: 14 až 18 hodin
  - optimální interval od stádia 8 buněk do 16 buněk: 20 až 30 hodin

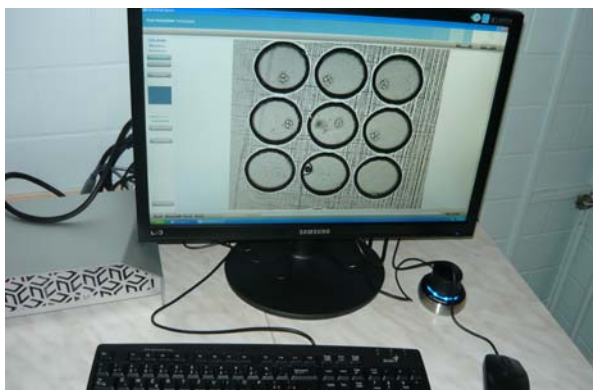
### **Závěr:**

Metodou výběru embrya na základě kontinuálního monitorování a hodnocení jeho vývoje jsme významně zvýšili úspěšnost asistované reprodukce. Embrya s nepravidelným dělením mají limitovaný vývojový potenciál, mají četné chromozomální abnormality a neměla by být transferována. Kontinuální hodnocení je objektivní, neboť podává přesné výsledky dělení buněk dle daného časového harmonogramu. Je založeno na hodnocení vývojového stadia embrya a posouzení dynamiky jeho vývoje.

Kontinuální monitorování vývoje přineslo významný pokrok v hodnocení embryí, neboť nejdůležitější momenty v dělení buněk, svědčící o kvalitě embrya, zůstávají při pouhém stacionárním pozorování skryty.

**Tab. 9: Přehled celkového počtu monitoringů a počtu gravidit v jednotlivých letech na GPK LF MU a FN Brno**

Rok	Počet monitoringů + embryotransfer	Počet gravidit	PR (%)
2011 zaváděcí obd.	22	9	40,9
2011	19	9	47,4
2012	35	12	34,3
2013	75	30	40,0
Celkem	151	60	39,7



Obr. 35: Monitorovací zařízení Primo Vision System



Obr. 36: Kamera v CO<sub>2</sub> inkubátoru

# **PUBLIKACE XXI**



# PICSI – selekce zralých spermií pro oplození lidských oocytů metodou ICSI

J. Žáková, E. Lousová, I. Crha, P. Ventruba, M. Pohanka, P. Nentwichová, H. Pochopová

**Souhrn:** *Cíl práce:* PICSI (Preselected Intracytoplasmic Sperm Injection) využívá možnosti vybrat k oplození oocytů metodou ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) zralou spermii na základě její schopnosti vázat se na hyaluronan. Receptor, který umožňuje tuto specifickou vazbu, je vytvořen na hlavičce zralé spermie. Cílem práce bylo zjistit, zda použití selektovaných spermií zlepší úspěšnost léčby. *Materiál a metodika:* Selekcí spermií se provádí na speciální misce se třemi mikrokapkami hyaluronanu, na které se naváží zralé spermie. Po inkubaci jsou pomocí mikromanipulační pipety tyto spermie vybrány a použity k oplození vajíček metodou ICSI. *Výsledky:* Oplození oocytů pomocí PICSI bylo provedeno u 40 pacientek, procento oplození bylo 93,4 % oproti dlouhodobému průměru 89,2 % při ICSI bez selekce spermií. Z 38 transferů bylo dosaženo 21 klinických těhotenství, pregnancy rate (PR) 55,3 % oproti standardní metodě ICSI s dlouhodobým průměrem PR 38,2 %. *Závěr:* PICSI je perspektivní metodou pro zlepšení výsledků ICSI.

**Klíčová slova:** ICSI - PICSI - spermie - neplodnost - hyaluronan

**Summary:** *PICSI - mature sperm selection for human oocyte fertilization by ICSI method. Aim of the study:* PICSI (preselected intracytoplasmic sperm injection) utilizes the ability of mature sperm to bind to hyaluronan to select mature sperm for oocyte fertilisation by ICSI (intracytoplasmic sperm injection). It is only the mature sperm head that has a receptor for this specific attachment. The aim of this study was to determine whether PICSI increases treatment success. *Material and methods:* Special PICSI dishes (PICSI® Sperm Selection Device MidAtlantic Diagnostics, Inc.) with three microdrops of hyaluronan at the bottom were used for sperm selection. During incubation, mature spermatozoa bound to the hyaluronan layer. Micromanipulation pipettes were used to collect bound sperms and these sperms were used for ICSI. *Results:* PICSI was used for mature sperm selection in 40 couples. Fertilization rate was 93.4% compared to our centre's standard (no sperm selection) ICSI long-term results of 89.2%. Thirty eight embryo transfers resulted in 21 clinical pregnancies (pregnancy rate 55.3 %) compared to our centre's standard ICSI long-term results of 38.2%. *Conclusion:* PICSI appears to be a useful method for improving ICSI results.

**Key words:** PICSI - ICSI - spermatozoon - infertility - hyaluronan

## Úvod

Provedení analýzy spermatu před zpracováním pro oplození oocytů spočívající ve stanovení koncentrace, pohyblivosti a morfologie spermií neposkytuje informaci o schopnosti spermií oplodnit oocyt. Nezískáme informaci o dalších aspektech, jako je zralost jádra, integrita chromatinu, schopnost vazby spermie na oocyt. Relativně dobrý spermioqram nezaručuje oplození oocytu a zdárný vývoj embrya. Nehledě k faktu, že při in vitro fertilizaci je třeba oplozovat oocyty takovým spermatem, který je k dispozici a který velmi často nespĺňuje ani hraniční normy. Při obvyklých postupech ICSI jsou spermie pro injekci selekto-

vány vizuálně na základě jejich morfologie a pohyblivosti. Metodou PICSI je v každém případě vybrána kvalitnější spermie, než by byla vybrána náhodně.

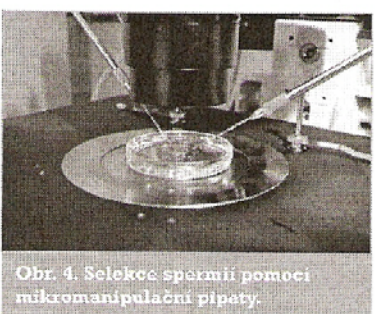
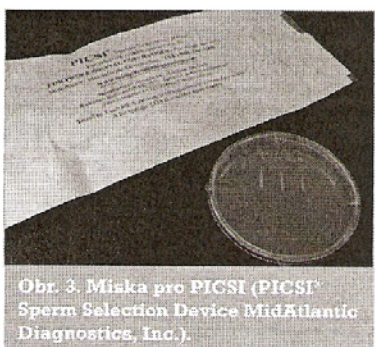
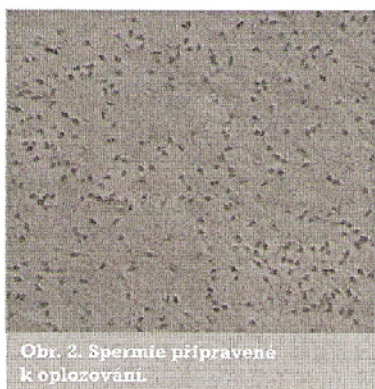
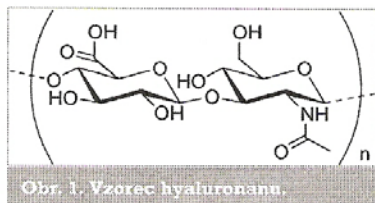
PICSI využívá možnosti selekce zralých spermií na základě jejich schopnosti vázat se k hyaluronanovému hydrogelu, neboť pouze hlavička zralé spermie nese receptor, který tuto vazbu umožňuje [1]. Kyselina hyaluronová je hlavní komponentou cumulus oophorus - vrstvy buněk obklopující oocyt. Chemicky se jedná o polypeptid tvořený z opakujících se jednotek N-acetylglukozaminu a kyseliny glukuronové (obr. 1). Při oplození je z akrozomu spermie uvolňován mimo jiné enzym hyaluronidáza, který rozrušuje

spoje buněk corona radiata a umožňuje vazbu spermie k zona pellucida. Bylo prokázáno, že spermie selektované touto technikou jsou viabilní, bez retence cytoplazmy, mají nižší fragmentaci DNA a nižší markery apoptózy [2]. Protože zralé spermie mají výrazně nižší výskyt chromozomálních aberací, je tato metoda považována za efektivnější ve smyslu úspěšnosti oplodnění. Cílem této práce bylo zjistit, zda takto selektované spermie zvýší procento oplozených oocytů, kvalitních embryí a dosažených klinických těhotenství.

## Materiál a metodika

Metoda PICSI byla provedena u pacientek našeho Centra asistované





reprodukce, kterým byla doporučena buď na základě dřívějších neúspěšných cyklů po transferu embryí, nebo z důvodu velmi nízké kvality spermatu.

Spermie jsou po zhodnocení spermioqramu dle WHO [3] připraveny pro oplození. Zpracování probíhá buď standardní metodou centrifugace a swim-up (Sperm Preparation Medium, Origio), nebo použitím SupraSperm média (Origio) pro izolaci živých spermií metodou hustotního gradientu. Po vycestování spermií z peletky na dně zkumavky do 200  $\mu$ l navrstveného média (Universal IVF Medium, Origio) jsou spermie připraveny pro použití (obr. 2). Miska pro PICSI (PICSI® Sperm Selection Device MidAtlantic Diagnostics, Inc.) je polystyrenová kultivační miska se třemi mikrokapskami hyaluronanu přichycenými na vnitřní stranu dna misky. Kapky jsou pro zviditelnění označeny liniemi na vnější straně dna misky (obr. 3). Hyaluronové mikrokapsky je třeba před přidáním spermií nejdříve hydratovat médiem, což způsobí nabobtnání gelu a umožní vazbu spermií. Nabobtnání a vazba spermií začne v normálním případě do 5 min. nebo dříve, starší mikrokapsky potřebují pro dosažení plné vazebné kapacity hydratovat 30 min. i déle. Správnou hydrataci poznáme tak, že hydrogel nabobtná a dojde k vazbě spermií. Hodnotíme po 5 min., a pokud je málo vázaných spermií, necháme inkubovat déle. Zralé spermie rozpoznají strukturu hyaluronanu a navážou se na něj. Poznáme je tak, že nevykazují progresivní pohyb ani při intenzivním pohybu bičíku. Pomocí mikromanipulační pipety jsou následně tyto spermie nasáty, přeneseny do samostatné kapky média v dostatečném počtu dle počtu připravených oocytů a použity k injekčnímu vpravení do cytoplazmy metodou ICSI (obr. 4).

### Výsledky

Od července do konce října 2010 podstoupilo na našem pracovišti oplození oocytů pomocí PICSI 40 pacientek. Oplozováno bylo 152 MII oocytů, průměr na jednu pacientku 3,8 oocytů (1-12). Ve 34 případech (85,0%) byl spermioqram pod hranicí normy buď

ve všech, nebo alespoň jednom parametru - koncentrace spermií (mil/ml), procento pohyblivých spermií, morfologie. U devíti párů se jednalo o první cyklus léčby, v případě jedné pacientky to byl již 7. léčebný cyklus. Oplození bylo dosaženo u 142 oocytů (FR 93,4%) oproti dlouhodobému průměru 89,2% při ICSI bez selekce. Transfer embryí byl proveden u 38 pacientek, přičemž u 21 z nich bylo dosaženo těhotenství (PR 55,3%). U standardní metody ICSI je dlouhodobě dosahováno PR 38,2% (graf 1).

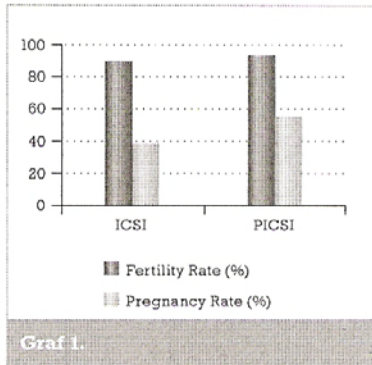
### Diskuze

Použití hyaluronanu k selekci spermií je bezpečná metoda, neboť hyaluronan se normálně nachází v ženském reprodukčním traktu a v cumulus oophorus. Je tedy pravděpodobné, že se hyaluronan dostává do oocytu se spermií dokonce i při in vivo koncepci. Při výběru spermie navázané na hyaluronan mikromanipulační pipetou je možné, že několik molekul hyaluronanu zůstane přichycených ke spermií, nebo že několik čtverečných mikrometrů membrány spermie zůstane přichyceno k hyaluronanu. V každém případě se fertilizace takto selektovanou spermií neliší od přirozené fertilizace [2]. Dle našich zkušeností nemá metoda na fertilizaci žádný negativní vliv.

Očekávaná výhoda PICSI spočívá v tom, že u spermií selektovaných pomocí hyaluronanu je frekvence chromozomálních disomií a diploidií v normálním rozmezí, a to nezávisle na frekvenci aneuploidií v počátečním spermatu. V tomto ohledu jsou tedy vlastnosti hyaluronanu podobné vlastnostem zona pellucida. Bylo prokázáno, že takto selektované spermie jsou životaschopnější, zbažené histonů a bez apoptózy [4,5]. Paternální přínos těchto „kvalitnějších“ spermií by měl vést ke snížení výskytu potratů.

Vazba zralých spermií může také souviset s poškozením jejich membrán v souvislosti s oxidačním stresem [6,7]. Studie mohou v tomto směru přinést zajímavé výsledky.





Přesto, že se jedná o malý soubor, výsledky procenta oplozených oocytů i dosažených klinických gravidit nás vedou k závěru, že selekci spermií metodou PICSI lze dosáhnout lepších výsledků v oplození oocytů, vývoji embryí a vyššího pregnancy rate. Při ICSI je obežita normální interakce spermie – oocyt, kde cumulus oophorus a zona pellucida tvoří přirozenou bariéru pro nezralé spermie. Proto lze PICSI doporučit vždy při nízkých hodnotách spermigramu, kde je indikována ICSI.

### Závěr

PICSI je perspektivní metodou pro zlepšení výsledků ICSI. Lze ji doporučit v případě nízkého počtu oplozených oocytů, nedostatečného vývoje embryí v předchozích výkonech a v případě opakovaných těhotenských ztrát.

*Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR NS/9661-4.*

### Literatura

- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003; 79(3): 1616-1624.
- Jakab A, Sakkas D, Delpiano E et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploides. *Fertil Steril* 2005; 84(6): 1665-1673.
- World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. 4th edn. Cambridge University Press, 1999.
- Cayli S, Sakkas D, Vigue L et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bclx expression in mature and diminished maturity spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 365-372.
- Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 292-298.
- Crha I, Kralikova M, Melounova J. et al. Seminal plasma homocysteine, folate and cobalamin in men with obstructive and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*, 2010; 27: 533-538.
- Oborna I, Wojewodka G, De Sanctis JB et al. Increased lipid peroxidation and abnormal fatty acid profiles in seminal and blood plasma of normozoospermic males from infertile couples. *Hum Reprod* 2010; 25: 308-316.

Doručeno do redakce: XX. XX. 2010  
Přijato po recenzi: XX. XX. 2010

RNDr. Jana Žáková, Ph.D.  
Ing. Eva Lousová  
doc. MUDr. Igor Crha, CSc.  
prof. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.  
doc. MUDr. Michal Pohanka, Ph.D.  
Petra Nentwichová  
Hana Pochopcová  
Gynekologicko-porodnická klinika  
LF MU a FN Brno  
jzakova@fnbrno.cz



## **PUBLIKACE XXII**

# Proteom seminální plazmy u mužů s azoospermií

I. Crha<sup>1</sup>, H. Konečná<sup>2</sup>, J. Žáková<sup>1</sup>, J. Buršíková<sup>2</sup>, Z. Zdráhal<sup>2</sup>,  
E. Lousová<sup>1</sup>, P. Ventruba<sup>1</sup>, M. Pohanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, LF MU a FN Brno

<sup>2</sup>Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Přírodovědecká fakulta a CEITEC, Masarykova univerzita, Brno

**Souhrn:** *Cíl:* Seminální plazma obsahuje proteiny, které jsou důležitými markery patologií reprodukčního ústrojí. Cílem práce je analyzovat rozdíly detekované v proteomu seminální plazmy mužů s azoospermií a dárců spermatu. *Materiál a metodika:* Vzorky seminální plazmy byly získány standardním postupem od mužů s azoospermií a dárců spermatu a zamrazeny v kapalném dusíku. Proteiny ve vzorcích byly solubilizovány lyzačním pufrem obsahujícím detergent CHAPS. Výsledné proteinové izoláty byly separovány dvourozměrnou gelovou elektroforézou (2-DE). V prvním rozměru byl pro izoelektrickou fokusaci použit imobilizovaný gradient pH 3-10 NL, pro dělení v druhém rozměru 12 % SDS-PAGE. Proteiny v gelu byly barveny fluorescenčním barvivem Sypro Ruby. Kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly vyhodnoceny pomocí programu PDQuest. Proteiny ve vybraných spotech vykazující rozdíly byly následně štěpeny trypsinem a identifikovány pomocí MALDI-MS/MS (resp. LC-MS/MS) a vyhodnocovacího programu Mascot. *Výsledky:* Vyšetření byla provedena na vzorcích od 6 dárců spermatu a 6 mužů s azoospermií. V proteomu dárců spermatu s normospermií byly nalezeny minimální rozdíly, mezi dárci spermatu a skupinou pacientů s azoospermií byly zjištěny četné kvalitativní a kvantitativní rozdíly. Na základě výsledků analýzy obrazu bylo pomocí hmotnostní spektrometrie identifikováno 18 kvalitativně odlišných proteinů. *Závěr:* Bylo nalezeno 18 kandidátních proteinů, které mohou být potenciálními biomarkery azoospermie. Komparativní proteomika je perspektivním nástrojem výzkumu poruch plodnosti a oxidačního stresu.

**Klíčová slova:** proteom - neplodnost - azoospermie - oxidační stress

## Seminal plasma proteome in men with azoospermia

**Summary:** *Objective:* Seminal plasma is a potential source of biomarkers of many disorders of male reproductive organs. Identification and characterization of individual proteins in seminal plasma could be a useful tool for estimating male infertility. The aim of the study was to analyze proteome differences in men with azoospermia and normospermia. *Material and methods:* Samples of seminal plasma from men with azoospermia and normospermia were collected and cryopreserved in liquid nitrogen. Detergent CHAPS was used to solubilize the sample proteins. Two dimensional (2-D) gel electrophoresis was used to separate protein isolates. Immobilized gradient pH 3-10 NL was used for isoelectric focusing and 12% SDS-PAGE was used for second dimension. Sypro Ruby dye was used to stain the proteins. Software PDQuest was used to analyze quantitative and qualitative differences. Selected proteins were digested by trypsin and identified by MALDI-MS/MS or LC-MS/MS and (using) the Mascot software. *Results:* Six azoospermia and six normospermia samples were analyzed. Minimal differences in proteomic profile were found among normospermia samples. Significant quantitative and qualitative differences were detected between men with normospermia and azoospermia. Image analysis and mass spectrometry identified eighteen different proteins. *Conclusion:* Eighteen proteins were found that could serve as potential markers of azoospermia. These results provide an important basis for comparative proteomics of infertility and oxidative stress.

**Key words:** proteome - male infertility - azoospermia - oxidative stress

Použité zkratky:	2-DE	dvourozměrná gelová elektroforéza
	CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
	DTT	dithiotreitol
	IEF	izoelektrická fokusace
	%T	celková koncentrace akrylamidu v gelu
	SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v dodecylsulfátu sodném
	MALDI-MS/MS	matrix-assisted laser desorption/ionization tandemová hmotnostní spektrometrie
	LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií



### Úvod

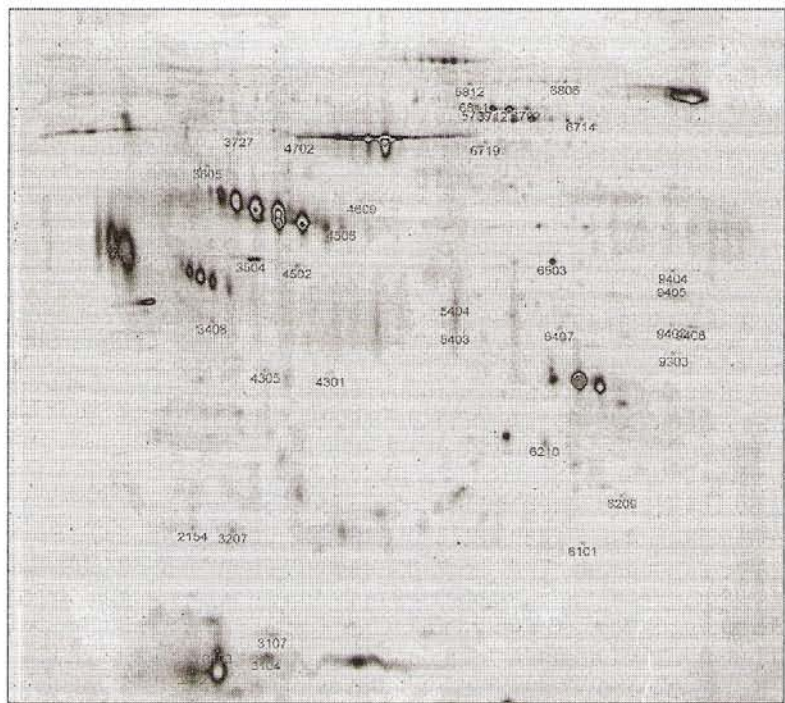
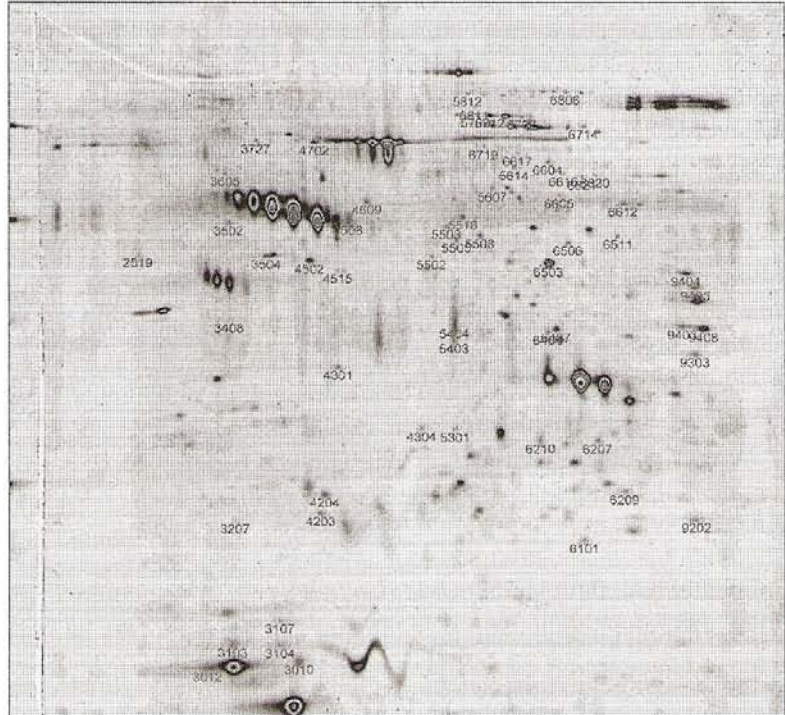
Seminální plazma je důležitou složkou spermatu, vytváří „životní prostředí pro spermie“. Obsahuje mnoho proteinů, jejichž zdrojem je varle, nadvarle a přídatné žlázy. Vyskytují se v něm mimo jiné proteiny, které jsou důležitými markery patologií reprodukčního ústrojí. Patologie spermatu jsou spojeny s rozdílnou expresí proteinů přítomných v seminální plazmě. Technologie dvourozměrné gelové elektroforézy kombinovaná s identifikačními možnostmi hmotnostní spektrometrie byla úspěšně aplikována na komplexní proteom spermatu [1]. Cílem práce je analyzovat rozdíly detekované v proteomu seminální plazmy mužů s azoospermii a dárců spermatu.

### Materiál a metodika

Vzorky seminální plazmy byly získány standardním postupem od mužů s azoospermii a dárců spermatu a zamrazeny v kapalném dusíku. Byly použity vzorky spermatu dárců s nor-

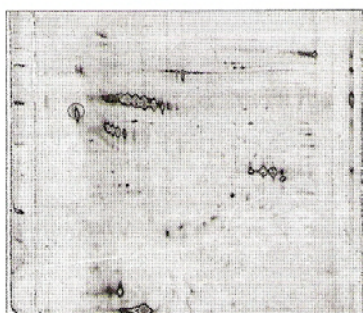
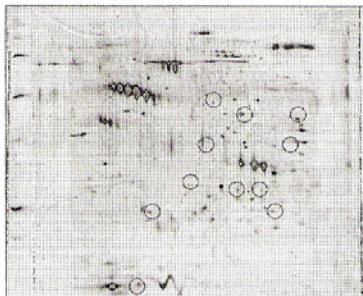


Obr. 1 a, b. Porovnání vyšetření 2 vzorků normospermie vs. normospermie - bez zřejmých rozdílů (2-DE seminální plazma, IEF 3-10 NL, SDS-PAGE 12 % T dva paralelní velké gely. Barvení: Sypro Ruby).



Obr. 2 a, b. Vyhodnocení rozdílných spotů u vzorků azoospermie pomocí software PDQuest (2-DE seminální plazma, IEF 3-10 NL, SDS-PAGE 12 % T dva paralelní velké gely. Barvení: Sypro Ruby).





Obr. 3 a, b. Vyznačení rozdílných spotů ve vzorku azoospermie a normospermie (2-DE seminální plazma, IEF 3–10 NL, SDS-PAGE 12 % T dva paralelní velké gely. Barvení: Sypro Ruby).

Tab. 1 a. Přehled proteinů identifikovaných v seminální plazmě vzorků s normospermii (proteiny popsané v literatuře jsou označeny\*).

extracellular matrix protein
N-acetyl-beta-glucosaminidase
lactate dehydrogenase
prostate specific antigen precursor
apolipoprotein D
prostaglandin D synthase
epididymal secretory protein (E12)*
apolipoprotein J precursor
clusterin*
epididymal secretory protein E1 precursor*
fibrin beta
crystal structure of human fibrinogen
IgG heavy chain constant region
Ig kappa light chain
epididymal secretory protein E1 precursor*
fibrinogen alpha A
Ig light chain
annexin A11*
IgG heavy chain
alpha-1-B-glycoprotein
proactivator polypeptide isoform a preprotein

mospermii a mužů s opakovaně diagnostikovanou azoospermii vyšetřovaných v andrologické laboratoři Centra asistované reprodukce FN Brno. Ejakulát byl získán pomocí masturbace do polypropylenových nádobek v odběrové místnosti centra, a to po abstinenci 3–5 dnů. Analýza spermatu byla provedena podle manuálu WHO [2]. Pro stanovení počtu spermií byla použita Neubauerova komůrka. Centrifugací (2 790 g po 10 min) byla odstraněna seminální plazma, zamrazena v tekutém dusíku a transportována do Centrální laboratoře Oddělení funkční genomiky a proteomiky Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity.

Proteiny ve vzorcích byly solubilizovány lyzačním pufrem obsahujícím detergent CHAPS, močovinu, thiomočovinu a DTT. Výsledné proteinové izoláty byly separovány dvourozměrnou gelovou elektroforézou. V prvním rozměru byl pro izoelektrickou fokusaci použit imobilizovaný nelineární gradient pH 3–10 NL, pro dělení v druhém rozměru 12 % SDS-PAGE. Separované proteiny v gelu byly barveny fluores-

cenčním barvivem Sypro Ruby, které umožňuje nejenom lokalizaci, ale i kvantifikaci proteinu. Byla provedena počítačová analýza obrazu a kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly vyhodnoceny pomocí programu PDQuest. Proteiny ve vybraných spotech vykazujících rozdíly byly následně roboticky vyřezány a štěpeny trypsinem (in-gel digesce). Proteolyticky naštěpené peptidy příslušející proteinům z jednotlivých spotů byly analyzovány pomocí MALDI-MS/MS, resp. LC-MS/MS. K identifikaci proteinů na základě získaných MS/MS dat bylo použito programu Mascot.

### Výsledky

Vyšetření byla provedena na vzorcích od 6 dárců spermatu a 6 mužů s azoospermii. V proteomu dárců spermatu s normospermii byly nalezeny minimální rozdíly sledovaných spotů (obr. 1 a, b). Mezi dárci spermatu a skupinou pacientů s azoospermii byly zjištěny četné kvalitativní a kvantitativní rozdíly (obr. 2 a 3). Na základě výsledků analýzy obrazu byly pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovány kvalitativně odlišné proteiny (tab. 1 a, b).

Z námi prokázaných rozdílů ve vyšetřených proteinech již byly některé dříve publikovány - např. prolactin-induced protein, epididymal secretory protein (E12), precursor epididymálního sekrečního proteinu E1, annexin A4 a annexin A11. Námi zjištěné významné rozdíly v prostatic binding proteinu, glutathione transferáze T1, alpha-1-acid glycoproteinu, apolipoproteinu D a laktátdehydrogenáze B nebyly v dostupné literatuře nalezeny.

### Diskuze

V pečlivě provedené studii rozdílů v proteomu seminální plazmy u mužů s astenospermii byly prokázány významné rozdíly v 17 identifikovaných proteinech. Heat shock-related protein byl zvýšen, množství histonu H2A a cytoskeletálního aktinu bylo sníženo [3].

Tab. 1 b. Přehled proteinů identifikovaných v seminální plazmě vzorků s azoospermii (proteiny popsané v literatuře jsou označeny\*).

gelsolin isoform a precursor
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 precursor
fibronectin precursor
alpha-1-antitrypsin
L-plastin variant
serum albumin
cathepsin
lactate dehydrogenase B chain
apolipoprotein J precursor
protein PP4-X
annexin A4*
proteasome activator hPA28 subunit beta
peroxiredoxin-6
prostate specific transglutaminase
Ig lambda light chain
glyoxalase-1
GDP-dissociation inhibitor 1
glyoxalase-1
epididymal secretory protein E1 precursor*



Ve srovnávací studii interindividuálních rozdílů v proteomu seminální plazmy mužů s normospermii a azoospermii byly identifikovány markery neobstrukční (např. epididymal secretory protein E1, stabilin 2, prolactin-inducible protein) a jeden marker obstrukční azoospermie (guanine nucleotide-releasing protein) [4].

Katalogy proteinů a spermie i proteomu seminální plazmy umožňují referenční porovnání individuálních hodnot a identifikaci proteinu. Představují začátek nové éry výzkumu poruch plodnosti. Relativním omezením je v současné době dostupnost zařízení, které je schopno hmotnostní spektrometrii spolehlivě provádět. V univerzitních zařízeních se dostupnost těchto technologií zvyšuje a zároveň klesají i náklady na tato vyšetření.

Dalším důležitým krokem pro klinické využití proteomu bude stanovení funkce jednotlivých proteinů a jejich podílů na snížení plodnosti. Zajímavé výsledky mohou přinést také studie sledující oxidační stres a kvantitativní a kvalitativní změny jednotlivých proteinů [5-7].

Z klinického hlediska je důležité charakterizovat souvislosti mezi reparačními mechanismy DNA a její integritou [8].

### Závěr

Byly nalezeny kandidátní proteiny, které mohou být významnými biomarkery azoospermie. Vyšetření proteomu seminální plazmy přináší nové možnosti poznání patologie spermatu. Komparativní proteomika je perspektivním nástrojem výzkumu poruch plodnosti a oxidačního stresu.

*Podpořeno projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 0021622415 a 2B08060) a grantem IGA MZ ČR NS/9661-4.*

### Literatura

1. Nixon B, Aitken RJ. Proteomics of human spermatozoa. In: Krause WK, Naz RK (eds). Immune infertility: The impact of immune reactions on human infertility. Heidelberg: Springer-Verlag 2009.
2. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. Ženeva: World Health Organization 2010.
3. Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM et al. Identification of proteomic

differences in asthenozoospermic sperm samples. Hum Reprod 2008; 23(4): 783-791.

4. Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H et al. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. J Androl 2007; 28(6): 858-865.

5. Oborná I, Fingerová F, Hajdúch M et al. Lycoplen v terapii mužské plodosti. Čes Gynek 2007; 72(5): 326-329.

6. Oborná I, Wojewodka G, De Sanctis JB et al. Increased lipid peroxidation and abnormal fatty acid profiles in seminal and blood plasma of normozoospermic males from infertile couples. Hum Reprod 2010; 25(2): 308-316.

7. Crha I, Kralikova M, Melounova J et al. Seminal plasma homocysteine, folate and cobalamin in men with obstructive and non-obstructive azoospermia. J Assist Reprod Genet 2010; 27(9-10): 533-538.

8. Oliva R, Martínez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. Syst Biol Reprod Med 2008; 54(1): 23-36.

*Doručeno do redakce: 8. 2. 2011  
Přijato po recenzi: 10. 3. 2011*

**doc. MUDr. Igor Crha, CSc.**  
Gynekologicko-porodnická klinika,  
LF MU a FN Brno  
icrha@fnbrno.cz

## **PUBLIKACE XXIII**



## Nové metody zvyšující úspěšnost asistované reprodukce

Čes. Gynek.  
2012, 77, č. 2  
s. xxx-xxx

### New methods increasing assisted reproduction results

Žáková J., Ventruba P., Crha I., Lousová E., Sochorová K., Pohanka M., Huser M.

Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc., MBA

#### ABSTRACT

**Objective:** The brief review of historical development and application of the assisted reproduction methods at our centre and the recent methods increasing the assisted reproduction results. The new mentioned methods are sperm selection before the intracytoplasmatic sperm injection (PICS = preselected sperm intracytoplasmic injection) and continuous embryo development monitoring.

**Design:** Review article.

**Key words:** oocyte, sperm selection, embryo, cultivation, insemination, ICSI, PICS, monitoring.

#### SOUHRN

**Cíl:** Stručný přehled vývoje metod asistované reprodukce na našem pracovišti a představení nově zavedených metod, jejichž cílem je zvýšit úspěšnost asistované reprodukce. Mezi nové metody patří selekce spermií před intracytoplasmatickou injekcí do oocyty, navázáním na molekuly kyseliny hyaluronové (PICS = preselected sperm intracytoplasmic injection) a kontinuální monitorování vývoje embrya in vitro (Primo Vision System).

**Typ studie:** Přehledový článek.

**Klíčová slova:** oocyt, spermie, selekce, embryo, kultivace, inseminace, ICSI, PICS, monitoring.

#### ÚVOD

První dítě „ze zkumavky“ v ČSSR a v bývalé východní Evropě se na klinice narodilo roku 1982. Úspěchy brněnského kolektivu vzbudily mimořádnou pozornost u nás i v zahraničí.

Asistovaná reprodukce zaznamenala za 30 let výrazný rozvoj. Ve snaze zvyšovat úspěšnost resp. počty vzniklých těhotenství, prodělaly metody léčby poruch plodnosti a laboratorní techniky obrovský rozvoj a staly se nedílnou součástí reprodukční medicíny. Naše centrum průběžně aktivně rozvíjelo a stále rozvíjí nejnovější diagnostické a terapeutické postupy.

#### PŘEHLED VÝVOJE METOD ASISTOVANÉ REPRODUKCE, JAK BYLY ZAVEDĚNY NA NAŠEM PRACOVIŠTI

4.11. 1982 Porod prvního dítěte ze zkumavky v České republice a bývalé východní Evropě (světová prioritní metoda GIFT – transferu gamet do vejcovodu)

Porod prvního dítěte po metodě IVF v České republice

1991 První zamrazené vzorky spermií

1992 Zahájen program [13, 16]

1994 Zavedení prodloužené kultivace embryí [10]

Začátek standardního provádění mikromanipulačních technik (asistovaného hatchingu, AH) [9, 12]

1995 Zahájen program dárcovství spermií [14].

Zavedení techniky a porod prvního dítěte po této metodě oplozování v České republice [11]

1997 Zahájen

Zavedení metod získání spermií z nadvarlete (MESA) a varlete (TESE) [7]

1998 Zavedení kryokonzervace spermatu mužů před onkologickou léčbou [2]

2001 Klinické provádění a dosažení prvního těhotenství po PGD

2005 Kryokonzervace ovariální tkáně u žen před onkologickou léčbou [4]

2006 Zpracování metody získání spermií u mužů s retrográdní ejakulací [6]

2007 Zavedení metody rychlého mrazení – vitifikace

2008 Provádění nativních cyklů, kdy jsou oocyty získány bez hormonální stimulace nebo s minimální stimulací vaječníků

2010 Zavedení metody selekce spermií před oplozováním metodou ICSI, tzv. PICS

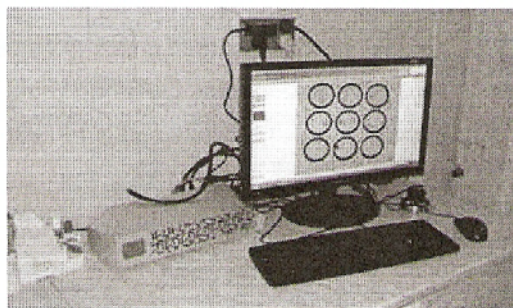
2011 Kontinuální monitorování vývoje embryí

#### NOVĚ ZAVEDENÉ METODY VEDOUcí KE ZVÝŠENÍ ÚSPĚŠNOSTI ASISTOVANÉ REPRODUKCE – METODY HODNOCENÍ KVALITY GAMET A EMBRYÍ

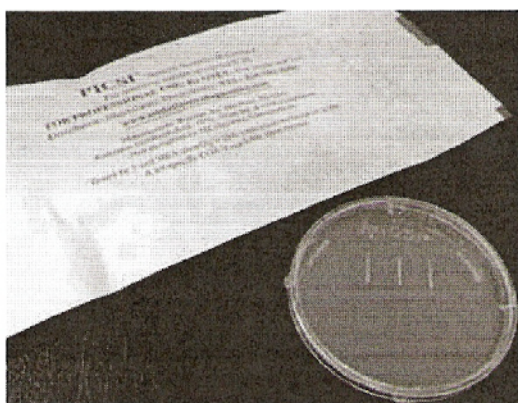
Dosažení těhotenství závisí kromě mnoha jiných faktorů na kvalitě transferovaných embryí. Kvalita



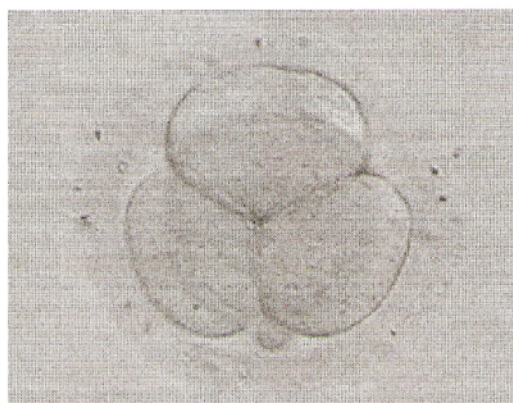
Obr. 1. Spermie zpracované pro inseminaci pomocí PICSI



Obr. 3. Primo Vision System



Obr. 2. Miska pro PICSI © Sperm Selection Device



Obr. 4. Pravidelně se dělicí embryo se 4 buňkami

a vitalita embrya vychází největší měrou, pomineme-li kultivační podmínky, z kvality gamet. Dokázat dostupnými prostředky co nejlépe hodnotit kvalitu gamet (oocytů, spermií) a kvalitu a následně výběr embryí k transferu se snaží mnoho metod.

**Kvalitu oocytů** hodnotíme při jejich získávání nejprve nepřímým hodnocením morfologie komplexu oocyt – cumulus oophorus pod vyhledávacím mikroskopem. Reálnější představu o stavu a zralosti oocytu získáme před oplozováním metodou intracytoplazmatické injekce spermie, kdy jsou oocyty zbaveny buněk cumulus oophorus a corona radiata. Tehdy je dobře patrné, zda jsou již v optimální fázi pro oplozování – v metafázi II, nebo naopak ještě ve stadiu zárodečného vajíčka. Dále lze hodnotit přítomnost pólového tělíska, jeho tvar, případně fragmentaci. Oocytů je však omezený počet a nelze vybírat, které se budou oplozovat a které ne.

**Spermie** má významný podíl na správném oplození oocytu a jeho dalším vývoji. Kvalita spermií pro oplozování se hodnotí dle parametrů jejich koncentrace, pohyblivosti a morfologie. Klasická příprava spermatu založená na migraci nebo sedimentaci spermií vede k získání spermií s lepší motilitou a morfologií. Morfologie a motilita neidentifikuje ovšem další charakte-

ristiky, jako jsou chromozomální aberace, defekty chromatinu a DNA. Znamená to tedy, že takto připravené spermie k inseminaci nejsou selektovány z hlediska optimálního fertilizačního potenciálu.

U zralých spermií byl prokázán výrazně nižší výskyt chromozomálních anomálií (viabilní, bez retence cytoplasmy, nižší fragmentace DNA). Byla tedy vyvíjena řada metod s cílem získat zralé, strukturně intaktní spermie s vysokou integritou DNA. Mezi tyto metody patří např. selekční metody založené na elektrických a magnetických vlastnostech spermií [3, 8], metody založené na apoptóze spermií, metody založené na ultramorfologii spermií a také selekční metody založené na zralosti membrány spermií [5].

Metoda PICSI je modifikovaná metoda standardního mikromanipulačního oplozování pomocí intracytoplazmatické injekce spermie do oocytu (ICSI) přičemž „P“ pochází ze slova „preselected“ (předem selektované spermie). Vychází z podstaty, že zralé spermie se vážou na hyaluronan - látku, která obklopuje vajíčko a podílí se na vazbě vajíčko-spermie. PICSI využívá možnosti selekce zralých spermií na základě jejich schopnosti vázat se k hyaluronanovému hydrogelu, protože pouze hlavička zralé spermie nese receptor,



který tuto vazbu umožňuje. Při oplození je z akrozomu spermie uvolňován mimo jiné enzym hyaluronidáza, který rozrušuje spoje buněk corona radiata a umožňuje vazbu spermie k zona pellucida.

Praktické provedení metody PICSI spočívá v tom, že výběr zralé spermie (obr. 1) pomocí mikropipety je vizuálně umožněn vazbou spermie ke kapce hyaluronanového hydrogelu na speciálně připravené, komerčně dodávané misce (PICSI Sperm Selection Device MidAtlantic Diagnostics, Inc.) (obr. 2). Životaschopná zralá spermie se pod mikroskopem vyznačuje pohybem bičíku, avšak nevykazuje pohyb, neboť její hlavíčka je navázána na kapku hydrogelu.

Metodu PICSI jsme zavedli v roce 2010 a dosahujeme s ní vyššího procenta oplozených oocytů i vyššího pregnancy rate [15]. Lze ji doporučit párům v případě nízkého počtu oplozených oocytů po ICSI nebo nedostatečného vývoje embryí v předchozích cyklech, v případě opakovaných těhotenských ztrát a při nízkých hodnotách spermiogramu.

#### Kvalita embryí

Ve snaze vybrat co nejkvalitnější embryo na transfer, se provádí v průběhu kultivace každodenní hodnocení jeho vývoje. U zygoty se sleduje symetrie provojader, přítomnost, rozložení a počet jadérek, pólová tělíska a jejich vzájemná pozice. U embryí se hodnotí počet blastomer v závislosti na délce kultivace a jejich morfologie, kterou vyjadřuje pravidelnost blastomer, stupeň fragmentace, počet jader, vakuoly atd.

Klasický způsob hodnocení embryí používaný běžně v laboratořích se provádí jednou denně pod mikroskopem, kdy embrya opouštějí na několik minut konstantní prostředí kultivačního boxu. V loňském roce jsme zavedli kontinuální hodnocení vývoje embryí pomocí zařízení Primo Vision System (Cryo-Innovation Technologies, Hungary). Sestává z kompaktního digitálního inverzního mikroskopu s kamerou umístěného v uzavřeném inkubátoru a z řídicí počítačové jednotky (obr. 3). Kamera každých 15 minut pořizuje 5s záznam, který je zobrazený na monitoru. Embrya jsou pro toto sledování umístěna na speciální misce v médiu pod olejem v 9 samostatných jamkách. Jedna miska je určená vždy pro jednu pacientku. K řídicí počítačové jednotce může být připojeno 6 sběrných kamer. Analýza morfologie a dynamiky vývoje se provádí z časosběrného digitálního záznamu na monitoru.

Pravidelnost a rychlost dělení embrya úzce souvisí s jeho správnou životaschopností a dosažením těhotenství. Pravidelné dělení buněk je projevem správného počtu chromozomů a genetické informace v nich obsažené (obr. 4). Odhalení poruch dělení buněk embrya, které je možné právě díky těmto záznamům, umožňuje vyřadit a netransferovat embrya s výskytem chromozomálních abnormalit, které by mohly vést k časnému potratům.

Kontinuální hodnocení je objektivní, neboť podává přesné výsledky dělení buněk podle daného časového harmonogramu. Pomáhá správně rozhodnout při výběru nejkvalitnějšího embrya, neboť je založeno nejen na

vývojovém stadiu embrya ale současně i na posouzení dynamiky jeho vývoje.

## ZÁVĚR

Uvedené metody PICSI a výběr embrya na základě kontinuálního monitorování a hodnocení jeho vývoje významně zvyšují úspěšnost asistované reprodukce, zvláště pak jejich kombinace může u některých párů zlepšit výsledky o 10–20 %. Kontinuální sledování vývoje přineslo velký zlom v možnosti hodnotit embrya, neboť ty nejdůležitější momenty v dělení buněk, svědčící o kvalitě embrya, zůstávaly při stacionárním pozorování skryty.

Přes povzbudivé výsledky, se stále hledají další klinicky snadno použitelné metody hodnocení kvality gamet i embryí.

Naše centrum asistované reprodukce poskytuje celou šíři nejmodernějších metod vedoucích k úspěšnosti srovnatelné s celosvětovou úrovní. Naší výhodou je, že se jedná o univerzitní centrum s kompletním klinickým zázemím, možností mezioborové spolupráce a zkušeným týmem odborníků.

## LITERATURA

1. Crha, I., Ventruba, P., Mardesic, T., Žáková, J. Dárceovství gamet – biologické, legislativní a etické aspekty. *Čes Gynecol*, 1997, 62, 2, s. 72–75.
2. Crha, I., Ventruba, P., Žáková, J., et al. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil Steril*, 2009, 91, 6, p. 2344–2348.
3. Fleming, SD., Hlad, RS., Griffin, AM., et al. Prospective controlled trial of an electroforetic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Hum Reprod*, 2008, 23, p. 2646–2651.
4. Huser, M., Juránková, E., Crha, I., et al. Kryokonzervace ovariální tkáně – šance na záchranu fertility žen s rakovinou. *Čes Gynecol*, 2007, 72, 1, s. 68–73.
5. Huszar, G., Jakab, A., Sakkas, D., et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online*, 2007, 14, p. 650–663.
6. Lousová, E., Žáková, J., Beharka, et al. Retrogradní ejakulace – jedna z příčin mužské neplodnosti. *Prakt Gyn*, 2008, 12, 1, s. 36–37.
7. Pačfk, D., Turjanica, M., Žáková, J. První zkušenosti s technikami MESA a TESE při léčbě infertilních mužů s azoospermii. *Rozhl Chir*, 1997, 76, 9, s. 463–467.
8. Said, TM., Agarwal, A., Zborowski, M., et al. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl*, 2008, 29, p. 134–142.
9. Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J., et al. Mikromanipulace v oblasti zona pellucida embrya: asistovaný hatching 1994–1995. *Gynekolog*, 1996, 5, s. 37–41.
10. Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J., et al. Prodloužená kultivace lidských embryí: srovnání kokultivace na lidských tubárních epitelích a kultivace v syntetickém médiu. *Čes Gynecol*, 1996, 61, s. 27–33.
11. Ventruba, P., Žáková, J., Crha, I., Němcová, S. Intracytoplasmatická injekce spermie do oocytu a asistovaný hatching – mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. *Prakt Gyn*, 1, 1997, s. 14–25.



12. Žáková, J., Ventruba, P., Adler, J., et al. Asistovaný hatching – přínosná mikromanipulační technika pro ženy s opakovaně neúspěšným embryotransferem. *Čes Gynecol*, 1996, 61, s. 6–9.
13. Žáková, J., Ventruba, P., Petrenko, M., et al. Factors influencing effectiveness of cryopreserved thawed embryo transfer. *Scr Medica*, 1998, 71, 1, s. 49–56.
14. Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Lousová, E. Sperm Donation Programme at the Centre of Assisted Reproduction in Brno: 1995 – 2005 results. *Scr Medica Brno*, 2005, s. 323–328.
15. Žáková, J., Lousová, E., Crha, I., et al. PICSI – selekce zralých spermií pro oplození lidských oocytů metodou ICSI. *Prakt Gyn*, 2010, 14, 4, s. 180–182.
16. Žáková, J., Ventruba, P., Lousová, E., et al. Kryokonzervace buněk a tkání v asistované reprodukci. *Prakt Gyn*, 2011, 15, 1, s. 16–21.

RNDr. Jana Žáková, Ph.D.  
Gynekologicko-porodnická klinika  
LF MU a FN Brno  
Obilní trh 11  
602 00 Brno  
e-mail: jzakova@fnbrno.cz

## Kortikotropin-releasing hormon (CRH) a adrenokortikotropní hormon (ACTH) – možné markery některých těhotenských patologií

Čes. Gynecol.  
2012, 77, č. 2  
s. xxx-xxx

Adrenocorticotropin hormone – possible marker of pregnancy pathologies

Hodická Z.<sup>1</sup>, Bienertová-Vašků J.<sup>2,3</sup>, Ventruba P.<sup>1</sup>, Vašků A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc., MBA

<sup>2</sup>Ústav patologické fyziologie FM MU Brno, přednosta prof. MUDr. A. Vašků, CSc.

<sup>3</sup>Klinika dětské onkologie, FN Brno, přednosta: prof. J. Štěrba, Ph.D.

### ABSTRACT

Adrenocorticotropin hormone (ACTH) is produced from the anterior pituitary gland and can be considered as one of the main elements of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. ACTH secretion is controlled by corticotropin-releasing hormone (CRH) from hypothalamus. ACTH stimulates the adrenal cortex. It affects synthesis and releasing of glucocorticoids, precursors of aldosterone, which affects the synthesis of mineralocorticoids. Preeclampsia and intrauterine growth retardation (IUGR) is one of the major pregnancy pathologies. The aetiology of these states are not clearly known, it is assumed that factors pathogenetic chain has been operating in early pregnancy. These factors are generally similar for both diseases. It is assumed that these pathologies will activate the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis both for mother and fetus. In research studies, maternal plasma CRH concentrations are elevated in complicated pregnancies. Etiopathogenesis of severe pregnancy pathologies such as IUGR, or preeclampsia is still unclear. Therefore, the research focuses on finding new markers that contribute to early diagnosis of serious states.

**Key words:** adrenocorticotropin hormone, corticotropin-releasing hormone, pregnancy, preeclampsia, uteroplacental insufficiency

### SOUHRN

Adrenokortikotropní hormon (ACTH) je produkován z předního laloku hypofýzy a můžeme jej považovat za jeden z hlavních elementů hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy. Sekrece ACTH podléhá řízení kortikotropního-releasing hormonu (CRH) z hypotalamu. CRH je silný vazodilatátor a významně se podílí na regulaci produkce prostaglandinů a sekreci ACTH. ACTH stimuluje kůru nadledvin, tím syntézu a výdej glukokortikoidů, podílí se dále na stimulaci prekurzorů aldosteronu, čímž ovlivňuje syntézu mineralokortikoidů a má i další metabolické účinky.

Preeklampsie a intrauterinní růstová retardace (IUGR) jsou jedny z nejzávažnějších těhotenských patologií. Etiologie těchto stavů není jednoznačně známá, předpokládá se, že faktory patogenetického řetězce působí již v časném těhotenství a jsou obecně podobné pro obě dvě onemocnění; dá se očekávat, že při těchto stavech bude jak u matky, tak u plodu docházet ke zvýšené aktivitě hypotalamo-hypofyzárně-adrenální stresové osy. Ve výzkumných studiích byla koncentrace CRH v plazmě žen, jejichž gravidita byla komplikována IUGR nebo preeklampsií, statisticky významně vyšší, než u žen s nekomplikovanou graviditou, což potvrzuje předpoklad zvýšené aktivity stresové osy u těchto těhotenských patologií. Ukazuje se také, že CRH může hrát důležitou roli v rámci mechanismů řízení udržení gravidity.

Etiopatogeneze závažných těhotenských patologií, jako jsou IUGR, nebo preeklampsie, je i přes velký pokrok v této oblasti stále nejasná. Proto se výzkum zaměřuje na hledání nových markerů, které by přispěly k včasné diagnostice těchto závažných stavů.

## 5. PERSPEKTIVY KLINICKÉ EMBRYOLOGIE A VÝVOJ MODERNÍCH METOD

Předpovědět vývoj moderních metod klinické embryologie, tak jako všeobecně u biologických věd, není jednoduchý. Ale cesty jak postupovat v tomto směru dál jsou nadějně a aplikovatelné z jiných oborů, které jsou podstatně dál. Vývoj se bude ubírat cestou změny laboratorních technologií a technického vybavení.

V přirozených podmínkách se preimplantační embryo vyvíjí v neustálém pohybu, který je způsoben svalovými kontrakcemi a pohybem řasinkových buněk při průchodu vejcovodem. Tento pohyb zajišťuje stálou obnovu okolní tekutiny. Při statické kultivaci v inkubátoru se nic podobného neděje. Proto se bude přecházet k vývoji **dynamického kultivačního systému**, který bude založený na třepání, rotaci, míchání, vibracích a kontrolovaném toku média.

Budou používány mikro a ultramikrokapky nebo mikrojamky se speciálními povrchy krytými třírozměrnými maticemi, které budou vytvářet podmínky podobné prostředí in vivo [46]. S narůstajícím rozvojem nano-a mikrofluidní technologie přicházejí nové technologické možnosti. **Mikrofluidní mikroprostředí** ve své podstatě lépe napodobuje prostředí pro vývoj in vivo.

Využití této technologie bude použitelné jak pro chemickou analýzu prostředí (transkriptom, proteom, metabolom, sekretom) až po neinvazivní výběr optimálních embryí [89]. Kombinace neinvazivních a invazivních přístupů dovoluji zkoumat oblast „- omics“ s přístupem k mRNA, proteinům a metabolitům, s potenciálem zvýšit pregnancy rate [82, 85]. Tato strategie by měla být cestou ke zlepšení kultivačního systému.

Dalším úkolem do budoucna je najít vhodný model pro **testování epigenetického efektu kultivačních médií** v lidské asistované reprodukci. Zdá se, že IVF ani ICSI neovlivňují metylaci DNA, avšak je zřejmé, že kultivace in vitro může defekty metylace indukovat [43, 62, 64]. Technicky je možné vynalézt test za použití embryonálních kmenových buněk nebo zvířecích modelů, avšak limituje nás to, že zatím neumíme interpretovat výsledky testování.

Dalším aspektem kultivace lidských embryí, který si zaslouží velkou pozornost je sledovatelnost resp. **ochrana záměny vzorků**. Nedávno byl navržený hlídací systém pomocí nálepek s čárovým kódem, kterým byly označeny všechny laboratorní pomůcky používané pro jednu pacientku. Nový přístup navrhuje přímé označení oocyty, kde je „značka“ umístěna přímo na zona pellucida. Míra identifikace počínaje oocytem až do stádia blastocysty je tedy 100 %, i po

mikromanipulaci či vitifikaci. Tento způsob by měl být dalším charakteristickým rysem kultivačního systému nové generace embryí v laboratoři budoucnosti [54].

Nové přístroje, jako robotický systém pro ICSI byl již úspěšně použit u křeččích oocytů, a klinické zkoušky mají začít v dohledné v budoucnosti [52]. Byla již také představena **plná automatizace dalších technik**, jako například kryokonzervace [113]. Jsou vyvíjeny dokonalejší software pro hodnocení záznamů kontinuálního vývoje a výběr embryí.

### **Závěr:**

Přestože plně robotická automatizace jako zatím futuristická vize může přinést větší objektivitu a kontrolu všech fází procesu v embryologické laboratoři, nikdo a nic, než embryolog může pozorovat, vyvozovat závěry, zjistit problémy a navrhnout řešení. Pouze **embryologové se svými nejlepšími znalostmi** mohou využít technologických pokroků a **zajistit příchod „nové generace embryí“**.



## 6. DATA Z EVROPSKÉHO A ČESKÉHO REGISTRU

Revoluční techniky zavedené v průběhu minulých desetiletí – ICSI, PGD, prodloužená kultivace až do stádia blastocysty, vitrifikace gamet, embryí i tkání jsou dnes rutinně používány na celém světě. Přispěly k úspěchu ART - počtu úspěšně léčených pacientů na IVF klinikách po celém světě a počtu nejméně 5,5 milionů narozených dětí.

Celosvětový stav v léčbě neplodnosti, dle výsledků generovaných z registrů Evropské společnosti pro lidskou reprodukci a embryologii [24] uvádí, že každý šestý pár má během svého života nejméně jednu problém s infertilitou. Ve 20-30 % případů jsou poruchy plodnosti na straně muže, ve 20-35 % na straně ženy, ve 25-40 % se jedná o problém obou partnerů a v 10-20 % není příčina známa. Infertilita je také spojena s faktory životního stylu jako kouření, obezita a stres. Dalším faktorem se vzrůstající věk žen, které si přejí otěhotnět. Nejvíce žen, které přicházejí k léčbě je ve věku 30 až 39 let. Podle údajů z roku 2010, ze kterého jsou posední dostupná data, provádějí evropská centra cca 55 % cyklů z celosvětových údajů. V roce 2010 bylo v **31 evropských zemích provedeno 565 031 léčebných cyklů**. Nejvíce cyklů bylo provedeno ve Francii, Německu, Itálii, Španělsku a Velké Británii. V Americe bylo provedeno 147 260 cyklů a 61 774 cyklů v Austrálii a na Novém Zélandu [102].

Celosvětově nejčastější fertilizační technikou je ICSI, která činí dvě třetiny všech fertilizací.

Nejvíce používanou technikou kryokonzervace oocytů a embryí je vitrifikace.

Každý rok se celosvětově provede okolo 1,5 milionu cyklů asistované reprodukce s cca 350 000 narozených dětí.

### Údaje z Národního registru asistované reprodukce České republiky

Národní registr asistované reprodukce (NRAR) eviduje údaje o provedených cyklech AR v České republice a je v plném provozu od 1.1.2007. Je veden ÚZIS, nezávislým státním úřadem, „cycle by cycle“, je prospektivní a povinný.

Data z Národního registru České republiky z let 2007 – 2011 uvádějí 107 529 cyklů asistované, což činí v průměru cca 21 500 cyklů za rok. Ve věkové skupině do 34 let je patrný postupný úbytek cyklů (ze 7200 na 5661), zatímco ve věkové skupině žen od 34 do 40 let cyklů mírně přibývá (z 773 na 4750). Největší nárůst zaznamenaly dárcovské cykly. V roce 2008 jich bylo 98, zatímco v roce 2011 jich bylo již 3523 [79].

## E. DISKUSE

Předkládaná práce je první práce v české literatuře, která se zabývá v přehledovém pojetí problematikou klinické embryologie. **Komentáře k jednotlivým publikacím** a zaváděným laboratorním metodám jsou proto uvedeny v širších teoretických souvislostech **a témata diskutována v příslušných kapitolách**. Stručně jsou zmíněny perspektivy klinické embryologie, vývoj moderních metod a data z evropského a českého registru.

Následující text předkládá několik témat k doplnění pohledu na klinickou embryologii.

Z předložené práce je zřejmé, že zavádění nových laboratorních metod do klinické praxe nebylo vždy jednoduché. Autorka prošla obdobím, kdy vedle laboratorní práce s gametami a embryi bylo nutnou součástí práce embryoga zvládnout výrobu médií, pipet, mikropipet, odběrových a transferových souprav a dalších pomůcek. Podmínky pro práci jsou v dnešní době jednodušší a příjemnější, neboť embryologové mají k dispozici veškeré materiály, pomůcky, média a přístroje. Na trhu je mnoho firem s nejrůznějšími modifikacemi veškerých potřeb pro asistovanou reprodukci.

Ne všechny metody, které byly postupně zavedeny, jsou využívány stejnou měrou. Některé metody jsou aktuální dodnes a jsou stále zdokonalovány (ICSI, PICSI), některé byly opuštěny brzy po zavedení (ZD, PZD, SUZI). Metoda prodloužené kultivace embryí do stádia moruly nebo blastocysty se stala běžnou každodenní praxí. Kryokonzervace je využívána pro velkou oblast výkonů a mnoho indikací.

Zvládnutí jednotlivých technik bylo náročné. Některé techniky jsou náročné na zručnost, některé na čas a některé na trpělivost pracovníka. Např. provádění mikromanipulací vyžadovalo před vlastním klinickým prováděním náročný trénink ovládnutí mikromanipulačního zařízení, zručnosti a nácvik jednotlivých pohybů mikropipetami na neoplozených oocytech. Příprava bioptovaného materiálu pro preimplantační genetické vyšetření vyžaduje zručnost, trpělivost a pečlivost. Metoda kontinuálního hodnocení embryí z time lapse záznamu vyžaduje čas a pečlivý odečet klíčových momentů vývoje embrya. Všechny **metody klinické embryologie vyžadují** od laboratorního pracovníka **nejen odborné znalosti, zručnost a dodržování pravidel laboratorní práce [99], ale také odpovědný přístup, spolehlivost, pečlivost a schopnost komunikace s pacientem**. Klinický embryolog musí kromě laboratorní práce

zvládat stále více i práci dokumentační a dodržovat požadavky zákona 296/2008, „Zákon o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (zákon o lidských tkáních a buňkách), Vyhlášky 422/2008 o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a Zákona č. 373/ 2011 Sb. „O specifických zdravotních službách (vybrané kapitoly)“.

Řada laboratorních metod a technik klinické embryologie slouží jednoznačně ke zlepšení léčby neplodnosti, avšak právě tyto výkony nejsou hrazeny zdravotními pojišťovnami. Jedná se o nejčastěji využívanou prodlouženou kultivaci embryí, mikromanipulační metody ICSI, PICSI a asistovaný hatching. Výběr kvalitních embryí pomocí kontinuálního monitorování jejich vývoje nebo využití programu dárcovství a ochrany fertility není rovněž pojišťovnami hrazeno. Všechny tyto přístrojově, materiálově i časově náročné metody si proto musí klienti uhradit sami. Podle současně platných zákonů hradí zdravotní pojišťovny základní výkony u třech cyklů IVF s přenosem embryí. Za podmínky přenosu pouze jednoho embrya v prvních dvou cyklech hradí zdravotní pojišťovna ještě čtvrtý cyklus. Důležitou podmínkou u ženy podstupující umělé oplodnění je věk 22 – 39 let, pouze při oboustranné neprůchodnosti vejcovodů je dolní hranice snížena na 18 let. Výkony jsou vykazovány na rodné číslo ženy, což může někdo považovat za diskriminující, neboť muž může během svého života dosáhnout ze zdravotního pojištění na více hrazených cyklů asistované reprodukce, než česká žena.

Jak už bylo uvedeno v úvodu, klinická embryologie existuje v České republice prakticky již 30 let. Dosud je realitou, že práci klinického embryologa vykonávají v centrech asistované reprodukce lékaři, přírodovědci, veterinární lékaři, zemědělství inženýři a další profese. Praktické zaměření oboru klinická embryologie a praktické kompetence embryologů do platnosti Vyhlášky č. 55/2011 Sb. nebyly určeny. Autorka habilitační práce spolu s dalšími členy výboru Asociace reprodukční embryologie (ARE), především s prof. MUDr. Pavlem Trávníkem, DrSc. a RNDr. Alicí Malenovskou ve spolupráci se Sekcí asistované reprodukce (SAR) ČGPS ČLS JEP zpracovali některé důležité materiály. Výbor ARE předložil pravidla pro činnosti a odpovědnosti pracovníků laboratoří, která vycházejí z vyhlášky a současně uvádějí modifikaci pro současný stav, kdy ještě nelze dodržet všechny předepsané podmínky odborné a specializované způsobilosti [134]. Výborem ARE byla také definována teoretická a praktická náplň oboru klinická embryologie, jako zdravotnického, vědeckého a vzdělávacího oboru [98].



## F. ZÁVĚR

Technologie asistované reprodukce zaváděné na našem pracovišti od 90. let minulého století (tab. 10) a používané v současné době se postupně vyrovnaly se všemi faktory neplodnosti, od tubární neprůchodnosti přes mužský faktor neplodnosti, endometriózu, dysfunkci ovulace, snížení ovariální rezervy až po neplodnost z nevysvětlitelné příčiny.

Asistovaná reprodukce se stala efektivní možností pro páry, kterým podstoupení PGD nebo PGS zabrání narození dítěte s genetickou zátěží. Onkologickým pacientům slouží techniky asistované reprodukce k zachování fertility i po agresivní onkologické léčbě.

Metody zaváděné do klinické praxe byly předmětem desítky grantových úkolů IGA MZ ČR I. kategorie, které byly na našem pracovišti řešeny.

**1.** V letech 1995 až 1996 byla studována kvalita **kultivačního prostředí** nepřímo, na základě posouzení ultrastruktury buněk cumulus oophorus a spermií, které byly kultivovány společně s oocytom. Dobře zachovaná ultrastruktura buněk cumulus oophorus i spermií svědčila o optimálních kultivačních podmínkách. Studium přítomnosti a působení kyslíkových radikálů v kultivačním systému vyplynulo, že všechny poškozené a zankající buňky kumulu a spermie jsou zdrojem ROS. Tyto poznatky vedly ke zkrácení doby, po kterou zůstávaly oocyty v kultivačním médiu společně s kumulárními buňkami a spermii.

Řešili jsme, jak **prodloužit délku kultivace embryí** in vitro, kdy stávající kultivační média neposkytovala vhodné prostředí pro vývoj embryí déle, než dva dny. Od roku 1993 jsme prodloužili dobu kultivace in vitro až na 120 hodin a dosáhli stádia blastocysty, společnou kultivací embryí, tzv. kokultivací, s lidskými oviduktálními buňkami. Od roku 1994 jsme začali využívat plně definované syntetické médium M3 (MediCult, Dánsko). Oba způsoby prodloužené kultivace byly plně srovnatelné v kvalitě embryí i procentu dosahovaných těhotenství. Postupně jsme od kokultivací upustili hlavně pro náročnost přípravy misek s monovrstvou oviduktálních buněk.

Prodloužená kultivace v syntetických médiích se stala naší každodenní praxí a je prováděna v 98,5 % výkonů IVF.

**2. Byly zavedeny mikromanipulační techniky oplozování oocytů.** Fertilizační mikromanipulace jsme začali provádět s perspektivou dosažení oplození nebo zvýšení procenta oplozených oocytů v případech těžkého androgického faktoru sterility. Metoda **ICSI** se stala od roku 1996 nejpřínosnější a nejpoužívanější mikromanipulační technikou. Je vhodná i v případech nízkého procenta oplozených oocytů až selhání oplození při normálních hodnotách spermioqramu, v případě malého množství získaných oocytů, u starších žen, pro oplozování v programu darovaných oocytů a před preimplantační genetickou diagnostikou. V současné době se provádí ve více než 90 % výkonů AR ročně.

V návaznosti na ICSI jsme zavedli metodiku pro použití spermií získaných mikrochirurgickými technikami **MESA/ TESE** a pro spermie získané z retrográdní ejakulace.

Od roku 1994 provádíme **asistovaný hatching**. Techniku, která napomáhá uvolnění embrya ze zona pellucida a tím jeho implantaci provádíme v současné době u 98,5 % embryotransferů.

Od roku 2001 provádíme **biopsie buněk pro PGD**, nejčastěji biopsii blastomer ze 6 až 8 buněčného embrya.

**3. Metody kryokonzervace gamet, embryí a tkání** jsme vyvíjeli od samých počátků v roce 1991. Vybuovali jsme **první a největší spermabanku**. Postupně jsme kryokonzervaci spermií začali využívat pro pacienty IVF programu a onkologické pacienty. Vybuovali jsme **Centrum pro ochranu fertility**. V neposlední řadě ochrana fertility do budoucna má svoje opodstatnění i u zdravých mužů.

**Kryokonzervaci embryí** jsme zavedli v roce 1995. Sloužila zpočátku k uchování nadbytečných embryí pro příští transfery. Postupně se uplatnění rozšířilo na program dárcovství embryí i pro ochranu fertility onkologicky nemocných žen.

**Mrazení oocytů** jsme poprvé provedli v roce 2003. Od roku 2010 mrazíme oocyty vitrifikací. Kromě dárcovského programu, a ochrany fertility, má mrazení oocytů význam pro ženy, které si zatím nepřejí těhotnět a mají zájem o zamrazení „mladých“ oocytů pro budoucí použití.

**Mrazení ovariální tkáně** jako ochranu fertility onkologicky nemocných žen jsme začali provádět jako **první centrum v ČR** a máme s ním největší zkušenost.

**4.** V návaznosti na technické možnosti a zvyšující se kvalitu laboratorní práce, se **zvyšuje úspěšnost léčby**. Se snahou snížit počet transferovaných embryí a tím **snížit počet vícečetných**

**gravidit**, narůstá v novém tisíciletí snaha vybrat jedno nejkvalitnější embryo na transfer. Byly hledány možnosti jak vybrat kvalitní gamety a jak poznat nejlepší životaschopné embryo.

Oocyty hodnotíme ve světelném mikroskopu podle morfologie, nejdříve komplexu oocyt-cumulus oophorus a po denudaci dle známek zralosti. Oocytů máme omezené množství, proto oplozujeme všechny zralé oocyty.

Konvenční analýza spermatu nepodává informace o další charakteristice spermií, proto jsme hledali jak v praxi najít nejlepší spermie k oplozování. V roce 2010 jsme zavedli **metodu PICI**, která umožnila využít další parametr **kvality spermie, její zralost** a s tím související genetický potenciál. V 71,5 % případů oplozování, kdy je nezbytné provést ICSI volí pacienti metodu PICSII s výběrem kvalitnějších spermií.

Kvalita embryí a jejich výběr pro embryotransfer byl od samých počátků hodnocen na základě morfologických znaků pomocí klasické mikroskopie. Z metod, které poskytují o embryu, jeho životaschopnosti a jeho genetické kvalitě další údaje jsme zavedli **dvě metody hodnocení kvality embryí**, a to PGD/PGS a kontinuální monitorování vývoje embryí.

Od roku 2000 provádíme ve spolupráci s externí genetickou laboratoří **PGD** a od roku 2013 **PGS** s využitím metody array CGH na principu mikročipové technologie.

Výběr embryí na základě **neinvazivního kontinuálního monitoringu embryonálního vývoje** pomocí Primo Vision Systému jsme zavedli do praxe v roce 2011. Kontinuálním snímáním vývoje embryí dostáváme přesné informace o pravidelnosti dělení buněk a dynamice vývoje v čase. Touto neinvazivní metodou výběru embrya jsme významně zvýšili úspěšnost asistované reprodukce.

Centrum asistované reprodukce GPK LF MU a FN Brno a jeho embryologická laboratoř bylo a je předním pracovištěm asistované reprodukce v České republice, které se zabývá vývojem a aplikací nových metod a poskytuje celou šíři nejmodernějších metod s úspěšností léčby srovnatelnou s celosvětovou úrovní. Nespornou výhodou našeho pracoviště je, že se jedná o univerzitní centrum s kompletním klinickým zázemím, možností mezioborové spolupráce a zkušeným týmem odborníků.



**Tab. 10: Přehled zaváděných metod a technik na pracovišti CAR GPK LF MU a FN Brno**

<b>Rok</b>	<b>Zavedená metoda</b>
<b>1991</b>	Kryokonzervace spermií
<b>1992</b>	Kryokonzervace embryí
<b>1994</b>	Prodloužená kultivace embryí
	Standardní provádění mikromanipuační techniky asistovaný hatching (AH)
<b>1995</b>	Zahájen program dárcovství spermií
	Intracytoplasmatická injekce spermie do oocyty (ICSI)
	Kryokonzervace spermatu mužů před onkologickou léčbou
<b>1997</b>	Program dárcovství oocytů a embryí
	Získání a zpracování spermií z nadvarlete (MESA) a varlete (TESE)
<b>2000</b>	Klinické provádění preimplantační genetické diagnostiky (PGD)
<b>2004</b>	Kryokonzervace ovariální tkáně u žen před onkologickou léčbou
<b>2006</b>	Získání spermií u mužů s retrográdní ejakulací
<b>2007</b>	Vitrifikace – metoda rychlého mrazení
<b>2010</b>	Kryokonzervace oocytů
<b>2011</b>	Kontinuální monitorování vývoje embryí (Primo Vision Systém)

## G. PUBLIKACE AUTORKY ZAŘAZENÉ V TEXTU

- Publikace I.....s. 24**  
Žáková J., Sedláčková M., Trávník P., Ventruba P. Morfologie buněk cumulus oophorus z komplexu oocyt-cumulus po oplození lidských oocytů in vitro. Gynekolog, 1996, 5, s. 209-212.
- Publikace II.....s. 29**  
Žáková, J., Sedláčková, M., Ventruba, P., Trávník, P. Vliv ultrastruktury spermií na výsledek fertilizace in vitro. Čes Gynek, 1997, 62, s. 3-6.
- Publikace III.....s. 34**  
Žáková, J., Ventruba, P., Adler, J., Trávník, P. Kokultivace embryí s buňkami lidského vejcovodu v programu asistované reprodukce na I. gynek. porod. klinice v Brně. Gynekolog, 1995, 4, s. 124-127.
- Publikace IV.....s. 39**  
Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J., Trávník, P., Komárková, J., Němcová, S. Prodloužená kultivace lidských embryí: srovnání kokultivace na lidských tubárních epitelích a kultivace v syntetickém médiu. Čes Gynek, 1996, 61, s.27-33.
- Publikace V.....s. 58**  
Ventruba, P., Žáková, J., Crha, I., Němcová, S. Intracytoplasmatická injekce spermie do oocytu a asistovaný hatching - mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. Prakt Gyn, 1997, 1, s. 14-25.
- Publikace VI.....s. 67**  
Pacík, D., Turjanica, M., Žáková, J. První zkušenosti s technikami MESA a TESE při léčbě infertilních mužů s azospermií. Rozhl Chir, 1997, 76, 9, s. 463-467.
- Publikace VII.....s. 73**  
Lousová, E., Žáková, J., Beharka, R., Ventruba, P., Pacík, D., Pochopová, H. Retrográdní ejakulace – jedna z příčin mužské neplodnosti. Prakt Gyn, 2008, 12, 1, s. 36-37.
- Publikace VIII.....s. 76**  
Žáková, J., Ventruba, P., Němcová, S. Assisted hatching - results in women with repeated embryotransfer failure. Proceedings of the IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, 1995, p. 539-541.
- Publikace IX.....s. 80**  
Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J., Crha, I., Trávník, P. Mikromanipulace v oblasti zona pellucida embrya: asistovaný hatching 1994 – 1995. Gynekolog, 1996, 5, s. 37-41.
- Publikace X.....s. 103**  
Žáková, J., Ventruba, P., Lousová, E., Crha, I., Hudeček, R. Kryokonzervace buněk a tkání v asistované reprodukci. Prakt Gyn, 2011, 15, 1, s. 16-21.

- Publikace XI.....s. 110**  
 Žáková, J., Ventruba, P., Petrenko, M., Višňová, H., Pelíšková, L. Factors influencing effectiveness of cryopreserved /thawed embryo transfer. *Scripta Medica*, 1998, 71, 1, p. 49-56.
- Publikace XII.....s. 118**  
 Crha, I., Ventruba, P., Mardesic, T., Žáková, J. Dárcovství gamet - biologické, legislativní a etické aspekty. *Čes Gynek*, 1997, 62, 2, s. 72-75.
- Publikace XIII.....s. 123**  
 Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Lousová, E. Sperm Donation Programme at the Centre of Assisted Reproduction in Brno: 1995 – 2005 results. *Scripta Medica Brno*, 2005, p. 323-328.
- Publikace XIV.....s. 130**  
 Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Bulínová, E., Lousová, E. Možnost využití darovaných gamet nebo embryí při léčbě neplodnosti. *Prakt Gyn*, 2006, 3, s.105–107.
- Publikace XV.....s. 133**  
 Crha, I., Ventruba, P., Petrenko, M., Žáková, J., Višňová, H., Kučera, M., Geryk, E. Kryokonzervace spermatu před onkologickou léčbou – 7 let zkušeností. *Čes Gynek*, 2002, 67, 6, s. 324–328.
- Publikace XVI.....s. 139**  
 Crha, I., Ventruba, P., Huser, M., Žáková, J., Hudeček, R., Jarkovský, J. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil Steril*, 2009, 91, 6, p. 2344-2348.
- Publikace XVII.....s. 145**  
 Žáková, J., Lousová, E., Ventruba, P., Crha, I., Pochopová, H., Vinklárková, J., Tesařová, E., Nussir, M. Sperm cryopreservation before testicular cancer treatment and its subsequent utilization for the treatment of infertility. *The Scientific World Journal*, 2014, article ID 575978, 5 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/575978>.
- Publikace XVIII.....s. 151**  
 Huser, M., Juránková, E., Crha, I., Ventruba, P., Hudeček, R., Žáková, J., Šmardová, L., Král, Z. Kryokonzervace ovariální tkáně - šance na záchranu fertility žen s nádorovým onemocněním. *Čes Gynek*, 2007, 72, 1, s. 68-73.
- Publikace XIX.....s. 158**  
 Žáková, J., Sedlackova, M., Polak, S., Dumkova, J., Ventruba, P., Crha, I. Methods for preserving fertility in young women suffering from cancer: some aspects of ovarian tissue cryopreservation. *Bratisl Med J*, 2012, 113, 3, p.192-194.
- Publikace XX.....s. 162**  
 Huser M, Žáková J, Crha I, Šmardová L, Král Z, Revel A, Ventruba P. Kryokonzervace ovariální tkáně u onkologických pacientek – 6 let klinických zkušeností. *Čes Gynek*, 2012, 77, 2, s. 118-126.



**Publikace XXI.....s. 189**  
Žáková, J., Lousová, E., Crha, I., Ventruba, P., Pohanka, M., Nentwichová, P., Pochopová, H. PCSI – selekce zralých spermií pro oplození lidských oocytů metodou ICSI. Prakt Gyn, 2010, 14, 4, s. 180-182.

**Publikace XXII.....s. 193**  
Crha, I., Konečná, H., Žáková, J., Buršíková, J., Zdráhal, Z., Lousová, E., Ventruba, P., Pohanka, M. Proteom seminální plasmy u mužů s azoospermií. Prakt Gyn, 15, 2011, 2, s. 2-5.

**Publikace XXIII.....s. 198**  
Žáková J, Ventruba P, Crha I, Lousová E, Sochorová K, Pohanka M, Huser M. Nové metody zvyšující úspěšnost asistované reprodukce. Čes Gynek, 2012, 77, 2, s.139-142.

## H. SEZNAMY

### 1. Seznam řešených grantů

#### Hlavní řešitel:

RNDr. Jana Žáková (1995-1996), grant MZ ČR č. 2703-2

Spoluřešitelé: Ventruba, P., Trávník, P., Sedláčková, M.

**Vztahy mezi buňkami cumulus oophorus a časným embryem při kultivaci in vitro.**

RNDr. Jana Žáková (1999–2001) grant MZ ČR č. 5164-3

Spoluřešitelé: Šťastná, J., Sedláčková, M., Ventruba, P., Crha, I., Vajčíková, H.

**Identifikace peroxisomů a jejich úloha v eliminaci poškození lidských zárodečných buněk kyslíkovými radikály při in vitro fertilizaci.**

#### Spoluřešitel:

Hl. řešitel: doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc. (1993-1994), grant MZ ČR č. 1770-2

Spoluřešitelé: Pilka, L., Čupr, Z., Trávník, P., Žáková, J., Unzeitig, V., Veselý, J.

**Asistovaná reprodukce II - Realizace nových metod v oblasti andrologické, imunologické, mikrobiologické, výpočetní techniky a kryokonzervace.**

Hl. řešitel: doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc. (1994-1995), grant MZ ČR č. 1820-2

Spoluřešitelé: Adler, J., Trávník, P., Žáková, J., Sedláčková, M.

**Optimalizace in vitro fertilizace kokultivací embryí s lidskými tubárními epitelii.**

Hl. řešitel: doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc. (1994-1995), grant MZ ČR č. 1821-2

Spoluřešitelé: Trávník, P., Adler, J., Žáková, J.

**Asistovaná fertilizace - mikromanipulace v oblasti zona pellucida zvyšující úspěšnost oplození a transferu embrya.**

Hl. řešitel: doc. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc. (1996-1998), grant MZ ČR č. 3804-3

Spoluřešitelé: Mardešić, T., Petrenko, M., Crha, I., Žáková, J., Višňová, H.

**Prevence komplikací metod asistované reprodukce - využití analýzy dat z Národního registru.** *Navrženo na cenu ministra zdravotnictví*

Hl. řešitel: MUDr. Igor Crha, CSc. (1997-1999) grant MZ ČR č. 4078-3

Spoluřešitelé: Ventruba, P., Hrubá, D., Žáková, J., Paseka, J.

**Vliv xenobiotik na fertilizaci lidských gamet a výsledky IVF.**

Hl. řešitel: MUDr. Martin Huser (2004–2007) grant IGA MZ ČR NR/8469-3

Spoluřešitelé: Višňová H, Ventruba, P., Žáková, J., Hudeček R, Šmardová, L., Král Z.

**Možnosti ochrany reprodukčních funkcí u žen podstupujících chemoterapii pro hematologickou malignitu.**

Hl. řešitel: doc. MUDr. Igor Crha, CSc. (2008-2011) grant IGA MZ ČR: NS 9661-4/2008

Spoluřešitelé: Ventruba, P., Žáková, J, Huser, M., Kubešová, J., Králíková, J., Matejovičová, M., Pohanka, M.

**Vliv metabolismu homocysteinu na poruchy plodnosti.**

## 2. Seznam zkratek

aCGH – array Comparative Genome Hybridization

AR – asistovaná reprodukce

ARE – Asicoace reprodukční embryologie

ART – asistované reprodukční techniky

AH – asistovaný hatching

CAR – centrum asistované reprodukce

CCD – Contactless Conductivity Detection

CEITEC – Central European Institute of Technology (Středoevropský technologický institut)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DMSO - dimethylsulfoxid

ET – embryotransfer

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology

FISH – Fluorescent In Situ Hybridisation

FN – Fakultní nemocnice

FSH – folikuly stimulující hormon

GIFT – Gamete IntraFallopian Transfer

GnRH – Gonadotropin releasing hormon

GPK – gynekologicko – porodnická klinika

hMG – human Menopausal Gonadotropin

HSA – Human Serum Albumin

ICM – Inner Cell Mass

ICSI – IntraCytoplazmic Sperm Injection

IMSI – IntraCytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection

IUI – intrauterinní inseminace

IVF – In Vitro Fertilizace

LF MU – Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

LH – luteinizační hormon

MS – Mass Spectrometry

MESA – Micro Epididymal Sperm Aspiration

NIR – Near Infrared Spectroscopy



PCR – Polymerase Chain Reaction  
PGD – preimplantační genetická diagnostika  
PGS – preimplantační genetický screening  
PICSI – Preselected IntraCytoplazmic Sperm Injection  
PR – Pregnancy Rate (% klinických těhotenství/embryotransfer)  
PZD – Partial Zona Dissection  
PROH – propandiol, propylenglykol  
ROS – Reactive Oxygen Species  
SAR – sekce asistované reprodukce  
SCD – Sperm Chromatin Dispersion  
SCSA – Sperm Chromatin Structure Assay  
SPG – spermogram  
SUZI – SubZonal Insemination  
TESE – Testicular Sperm Extraction  
TUNEL – Terminal transferase dUTP Nick End Labelling  
WHO – World Health Organisation  
ZD – Zona Drilling  
ZP – zona pellucida

### 3. Seznam obrázků

Obr. 1: Osobní setkání autorky s nositelem Nobelovy ceny, prof. Robertem Edwardsem

Obr. 2: CO<sub>2</sub> inkubátor Binder pro kultivaci embryí

Obr. 3: CO<sub>2</sub> inkubátor Sanyo pro kultivaci embryí

Obr. 4: Buňka cumulus oophorus preovulačního oocyty, světlé jádro (N), v cytoplasmě bohatá organelová výbava. Lipidové kapky (L), extracelulární matrix (ECM). Foto: Sedláčková, zvětšení: 6 400 x

Obr. 5: Část buňky cumulus oophorus od oplozeného oocyty. Mitochondrie s tubulózními kristami (M). Foto: Sedláčková, zvětšení: 23 000 x

Obr. 6: Spermie bez zjevných anomálií. Hlavička s intaktním akrozomem (→), kondenzovaný jaderný chromatin (N), střední oddíl (SO). Foto: Sedláčková, zvětšení: 15 300 x

Obr. 7: Monovrstva tubárních epitelí, zvětšení: 400x

Obr. 8: Blastocysta a neoplozený oocyt na monovrstvě tubárních epitelí, zvětšení: 250 x

Obr. 9: Stádia embryí při klasické a prodloužené kultivaci

Obr. 10: Mikroskop Leitz Fluovert FS s mechanickými mikromanipulátory Leitz

Obr. 11: Mikromanipulační pipety vlastní výroby, provádění asistovaného hatchingu

Obr. 12: Mikromanipulační zařízení (s mikroskopem Nikon Diaphot 300)

Obr. 13: Mikromanipulační zařízení (s mikroskopem Nikon Eclipse Ti)

Obr. 14: Detail mikropipet nad miskou pro mikromanipulace

Obr. 15: ICSI, oocyt v metafázi II, spermie vpravo v injekční mikropipetě, zvětšení: 320 x

Obr. 16: Testikulární tkáň po TESE

Obr. 17: Rozvolnění semenotvorných kanálků

Obr. 18: Krájení semenotvorných kanálků

Obr. 19: Semenotvorné kanálky, zvětšení: 40x

Obr. 20: Biopsie blastomery z 8 buněčného embrya, zvětšení: 400 x

Obr. 21: Kryokonzervační zařízení Planer Kryo 10

Obr. 22: Nádoba s tekutým dusíkem pro vitifikaci

Obr. 23: Pejety pro vitifikaci

Obr. 24: Kryotuby se zamrazeným spermatem

Obr. 25: Pomůcky pro provádění vitifikace: misky s kryoprotektivními médii, pejety na embrya (straws) jsou umístěné v nádobách v tekutém dusíku

- Obr. 26: Skladovací kontejnery s tekutým dusíkem
- Obr. 27: Odebraná ovariální tkáň
- Obr. 28: Zpracování ovariální tkáně před kryokonzervací
- Obr. 29: Komplex oocyt–cumulus oophorus, zvětšení: 40 x
- Obr. 30: Oocyt v metafázi II, zvětšení: 350 x
- Obr. 31: Maklerova komůrka k hodnocení spermiogramu
- Obr. 32: Miska pro PICSI
- Obr. 33: Spermie navázané na hyaluronan
- Obr. 34: Oplozený oocyt ve stádiu zygoty s prvojádry, v jádrech jsou patrna jádérka, zvětšení:  
300 x
- Obr. 35: Monitorovací zařízení Primo Vision Systém
- Obr. 36: Kamera v CO<sub>2</sub> inkubátoru



#### 4. Seznam tabulek

Tab. 1: Podíl cyklů, ve kterých byly oocyty oplozovány metodou ICSI z celkového počtu výkonů v letech 2003 – 2013 na GPK LF MU s FN Brno

Tab. 2: Nárůst výkonů s AH a procento pregnancy rate (PR) v počátečním období na GPK LF MU a FN Brno

Tab. 3: Podíl transferů, s provedeným asistovaným hatchingem v letech 2003 -2013 na GPK LF MU a FN Brno

Tab. 4: Minimální požadavky na parametry spermatu dárce na CAR GPK LFMU a FN Brno

Tab. 5: Počty mužů (onkologických pacientů) s kryokonzervovaným spermatem na GPK LF MU a FN Brno v letech 1995 – 2012

Tab. 6: Přehled onkologických diagnóz a počtu pacientů s kryokonzervovaným spermatem v letech 1995 – 2013 na GPK LF MU a FN Brno

Tab. 7: Hodnoty základních parametrů při hodnocení spermogramu dle WHO platné jako norma (4. a 5. edice manuálu)

Tab. 8 : „Timing“ sledování fertilizovaného oocytu a optimálního embryálního vývoje dle Istanbulského konsensu

Tab. 9: Přehled celkového počtu monitoringů a počtu gravidit v jednotlivých letech na GPK LF MU a FN Brno

Tab. 10: Přehled zavádění metod a technik na pracovišti CAR GPK LF MU a FN Brno

## I. LITERATURA

1. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul konsensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*, 2011, 26, 6, p. 1270-1283
2. Amorim, C.A., Van Langendonckt, A., David, A. et al. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod*, 2009, 24, p. 92-99.
3. Asch, R., Ellsworth, L., Balmaceda, J., Wong, P.C. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet*, 1984, 1, p.1034–1035.
4. Aitken, R.J., de Iuliis, G.N., Mc Lachlan, R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl*, 2009, 32, p. 46-56.
5. Baart, E.B., Martini, E., van den Berg, M. et al. Preimplantation genetic screening reverses a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 2006, 21, p. 223-233.
6. Barroso, G., Valdespin, C., Vega, E. et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril*, 2009, 92, p. 835-848.
7. Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N. Engl J Med*, 2001, 345, p.1067-1068.
8. Van Blerkom, J., Henry, G. Cytogenetic analysis of living human oocytes: cellular basis and developmental consequence of perturbations in chromosomal organization and complement. *Hum Reprod*, 1988, 3, p.777 – 790.
9. Bongso, A., Sathanathan, Ng P.L., Rauff, M., Ratnam, S. Improved quality of human embryos when co-cultures with human ampullary cells. *Hum Reprod*, 1989, 4, p. 706-713.
10. Botros, L., Sakkas, D., Seli, E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14, 12, p. 679-90.
11. Brison D.R., Houghton F.D., Falconer, D. et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod*, 2004, 19, p. 2319-2324.
12. Cohen, J., Wells, D., Munné, S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril*, 2007, 87, p. 496-503.
13. O'Connell, M.O., McClure, N., Lewis, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, 2001, 17, 3, p. 704-709.

14. Crha, I., Ventruba, P., Mardesic, T., Žáková, J. Dárcovství gamet - biologické, legislativní a etické aspekty. *Čes Gynek*, 1997, 62, 2, s. 72-75.
15. Crha, I., Ventruba, P., Petrenko, M., Žáková, J., Višňová, H., Kučera, M., Geryk, E. Kryokonzervace spermatu před onkologickou léčbou – 7 let zkušeností. *Čes Gynek*, 2002, 67, 6, s. 324–328.
16. Crha, I., Ventruba, P., Huser, M. et al. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil Steril*, 2009, 91, 6, p. 2344-2348.
17. Crha, I., Konečná, H., Žáková, J. et al. Proteom seminální plasmy u mužů s azoospermii. *Prakt Gyn*, 15, 2011, 2, s. 2-5.
18. Crha, I., Žáková, J. Současné možnosti výběru spermie v asistované reprodukci. *Moderní gynekologie a porodnictví*, 2012, 21, 1, s. 4-9.
19. Diedrich, K., van der Ven, H., Al-Hasani, S., Krebs, D. Ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1988, 3, p. 39-44.
20. Donnelly, E.T., McClure, N., Lewis, S.E.M. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*, 76, 5, 2001, p. 892-900.
21. Donnez, J., Dolmans, M.M., Demylle, D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004, 364, p. 1405-1410.
22. Dun, WB. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys Biol*, 2008, 5, p. 1–24.
23. Dvořák, M., Čupr, Z., Pilka, L. et al. Oplození in vitro a přenos embrya při léčbě lidské neplodnosti. *Sborník prací LF v Brně, Acta Facultatis Medicinae Universitatis Brunensis*, 1990, 106, 155 s.
24. ESHRE Guidelines and Legal. ART fact sheet. 2013, <http://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx>.
25. Feldschuh, J., Brassel, J., Durso, N., Levine, A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril* 2005, 84, 4, 1017.e3-1017.e4.
26. Fleming, S.D., Ilad, R.S., Griffin, A.M. et al. Prospective controlled trial of an electroforetic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Hum Reprod*, 2008, 23, p. 2646-2651.
27. Gandolfi, F., Moor, R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviductal epithelial cells. *J. Reprod Fertil*, 1987, 81, p. 23-28.



28. Gardner D. K. et al. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*, 1996, 65, p. 349-353.
29. Gardner, D.K., Lane, M., Schoolcraft, W.B. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod*, 2000, 16, 6, p. 9-23.
30. Gordon J.W., Talansky B.E. Assisted fertilization by zona dribling: A mouse model for correction of oligospermia. *J. Exp. Zool.*, 1986, p. 239-347.
31. Hardarson T., Ahlström T., Rogberg L., et al. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*, 2012, 27, p. 89–96.
32. Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K., Winston, R.M. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 1990, 344, p. 768-770.
33. Harper, J.C., Wilton, L., Traeger-Synodinos, J., et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*, 2012, 18, 3, 234-247.
34. Hlinka, D., Lazarovská, S., Rutarová, J., et al. Non-invasive monitoring of the timing of early embryo cleavages-objectively measurable predictor of human embryo viability. *Česká Gynek*, 2012, 77, 1, s. 52-7.
35. Huser, M., Juránková, E., Crha, I., Ventruba, P., Hudeček, R., Žáková, J., Šmardová, L., Král, Z. Kryokonzervace ovariální tkáně - šance na záchranu fertility žen s nádorovým onemocněním. *Čes Gynek*, 2007, 72, 1, s. 68-73.
36. Huser M, Žáková J, Crha I, Šmardová L, Král Z, Revel A, Ventruba P. Kryokonzervace ovariální tkáně u onkologických pacientek – 6 let klinických zkušeností. *Čes Gynek*, 2012, 77, 2, s. 118-126.
37. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*, 2003, 79, 3, s.1616 - 24.
38. Huszar. G., Jakab, A., Sakkas, D. et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod. Biomed. Online*, 2007, 14, p. 650-663.
39. Chen, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 1, 1986, p. 884-886.
40. Imoedemhe, D.G., Sigue, A.B. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. *J Assist Reprod Genet*, 9, 1992, s. 323-327.

41. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploides. *Fertil Steril*, 2005, 84, 6, p. 1665 - 73.
42. Joris H, De Vos A, Janssens R et al. Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser. *Hum Reprod*, 2003, 18, p. 1896–1902.
43. Katari, S., Turan, N, Bibikova, M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet*, 2009, 18, p. 3769-3778.
44. Katz-Jaffe, MG., Schoolcraft, WB., Gardner, DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril*, 2006, 86, p. 678–685.
45. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod*, 2007, 22, p. 1403–1409.
46. Krisher, R.L., Wheeler, M.B. Towards the use of microfluidics for individual embryo culture. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22, p. 32-39.
47. Laufer, N., Tarlatzis, B.C., De Cherney, A. Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1984, 42, p. 366-372.
48. Lanzendorf, S.E., Maloney, M.K., Veeck, L.L. et al. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril*, 1988, 49, p. 835-842.
49. Laws-King, A., Trounson, A., Sathanathan, H., Kola, I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril*, 1987, 48, p. 637.
50. Lemos EV, Zhang D, Van Voorhis BJ, Hu H. Healthcare expenses associated with multiple vs singleton pregnancies in the United States. *Am J Obstet Gynecol*, 2013, 209:586.e1-586.e11.
51. Lousová, E., Žáková, J., Beharka, R., Ventruba, P., Pacík, D., Pochopová, H. Retrogradní ejakulace – jedna z příčin mužské neplodnosti. *Prakt Gyn*, 2008, 12, 1, s. 36-37.
52. Lu Z., Zhang, X., Leung, C., et al. Robotic ICSI. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2011, 58, p. 2102-2108.
53. Mádr, A., Foltová, K., Žáková, J., Lousová, E et al. Stanovení životaschopnosti embryí v asistované reprodukci pomocí kapilární elektroforézy. Sborník abstrakt jubilejní 10. česko-slovenské konference reprodukční gynekologie a 21. symposia asistované reprodukce, 8.-9.11.2011, Brno, s. 35

54. Magli, C. New generation embryos. How the IVF lab can improve implantation. Focus on Reproduction, January 2014, p. 29-31.
55. Malter, H., Cohen, J. Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. Gamete Res., 1989, 24, p. 67-80.
56. Mastenbroek, S., Twisk, M., van der Veen, F., Repping, S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. Hum Reprod Update, Vol.17, No.4 p. 454-466, 2011
57. Meirow, D., Levron, J., Eldar-Geva, T. et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. N Engl J Med, 2005, 353, p. 318-321.
58. Menezo, Y., Hazout, A., Dumont, M., Herbaut, N., Niccolet, B.: Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humus. Hum Reprod, 1992, 7, p. 101-106.
59. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A. et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod, 2011, 26, p. 2658-2671.
60. Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M. et al. Embryo Incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. Fertil Steril. 2012, 98, p.1481-1489.e10
61. Mettler, L., Seki, M., Baukloh, V., Samm, K. Human ovum recovery via operative laparoscopy and in vitro fertilization. Fertil Steril, 1982, 38, p. 30-37.
62. Van Montfoort, A.P.A., Hanssen, L., de Sutter, P. et al. Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance. Hum Reprod Update, 2012, doi:10.1093/humus/dmr04
63. Munné, S., Fragouli, E., Colls, P. et al. Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test. Reprod Biomed Online, 2010, 20, p. 92-97.
64. Nelissen, E., Van Montfoort, A.P.A., Menheere, P. et al. Effect of IVF culture medium on human fetal growth. O-169, Hum Reprod, 2011, 26 (suppl), i67-i69.
65. Nixon, B., Aitken, R.J. Proteomics of human spermatozoa. In: Krause, W.K., Naz, R.K. (eds). Immune infertility: The impact of immune reactions on human infertility. Heidelberg, Springer-Verlag, 2009.
66. Opekar, F., Štulík, K. Elektrochemická detekce s elektrodami mimo roztok – znovuzrození kontaktních impedančních metod. Chem Listy, 2010, 104, s. 1148-1154.
67. Ouhibi, N., Menezo, Y., Benet, G., Niccollet, B. Culture of epithelial cells derived from the ovidukt of different species. Hum Reprod, 1989, 4, p. 229-235.



68. Pacík, D., Turjanica, M., Žáková, J. První zkušenosti s technikami MESA a TESE při léčbě infertilních mužů s azoospermii. *Rozhl Chir*, 1997, 76, 9, s. 463-467.
69. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, 340, p. 17-18.
70. Parmegiani, L., Garello, C., Granella, F. et al. Long-term cryostorage does not adversely affect the outcome of oocyte thawing cycles. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19, 3, p. 374-379.
71. Pilka, L., Tesařík, J., Dvořák, M. et al. Narození dítěte po přenosu krátkodobě kultivovaného oocytu do vejcovodu. *Čs Gynek*, 1983, 48, s. 324-326.
72. Pilka, L., Trávník, P., Dvořák, M. et al. Porod po nitroděložním přenosu embryí získaných fertilizací a kultivací oocytů in vitro. *Čs Gynek*, 50, 1985, s. 452 – 459.
73. Plachot, M., Antoine, J.M., Alvarez, S., Firmin, C. et al. Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod.*, 1993, 8, p. 2133-2140.
74. Porcu, E., Fabbri, R., Seracchioli, R. Birth of a healthy fiale after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril*, 1997, p. 724-726.
75. Pribenszky, C., Matyas, S., Kovacs, P. et al. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time –lapse monitoring. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21, p. 533-536.
76. Revel, A., Safran, A., Laufer, N. et al. Twin delivery following 12 years of human embryo cryopreservation: Case report. *Hum Reprod* 2004, 19, 2, p. 328-329.
77. Rienzi, L., Martinez, F., Ubaldi, F et al. Polscope analysis of meiotic spindle ganges in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod*, 2004, 19, p. 655-659.
78. Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., et al. Limited implantation Access of direkt-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril*, 2012, *Fert Steril*, 98, 6, p 1458-1463.
79. Řežábek, K. In vitro fertilizace – rozbor údajů Národního registru asistované reprodukce za roky 2007 -2011, *Čes Gynek*, 2012, 77, 4, s. 336 – 341.
80. Said, T.M., Agarwal, A., Zborowski, M. et al. Utility of magnetic cell separation as o molecular sperm preparation technique. *J. Androl.*, 2008, 29, p.134-142.
81. Sakkas, D., Trounson, A.O. Co-culture of mouse embryos with oviductal and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J Reprod Fertil*, 1990, 90, p. 109-118.

82. Scott, L., Berntsen, J., Davies, D., et al. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assesment. Human oocyte respiration-rate measurement – potential to improve oocyte and embryo selection? *Reprod Biomed Online*, 2008, 17, p. 461-469.
83. Sedláčková M., Šťastná J., Žáková J. Cytochemická detekce zdrojů peroxidu vodíku v kultivačním systému v průběhu fertilizace in vitro u člověka. *Scripta Medica*, 2001, 74, s. 415.
84. Sedláčková M., Šťastná J., Žáková J., Ventruba P. Failure of the in vitro fertilisation and production of hydrogen peroxide. *Plzeň lék sborn*, 2003, 78, Suppl., s. 49-52.
85. Seli, E., Botros, L., Sakkas, D., Burns, DH. Non-invasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton NMR correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2008, 90, p. 2183–2189.
86. Schoysman, R., Vanderzwalmen, P., Nijs, N.: Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*, 342, 1993, p. 1237.
87. Silber, S.J. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Mol Hum Reprod*, 2012, 18, p. 59-67.
88. Simon. L., Lutton, D., McManus, J., Lewis, SE. Sperm DNA damage measured by tje alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and IVF success. *Fertil Steril* 2010, 95, s. 652–657.
89. Smith, G.D. Microfluidics in human IVF laboratories, *Hum Reprod*, 2011, Abstracts of the 27th Annual Meeting of ESHRE, Stockholm, Sweden, 3 July – 6 July, i60.
90. Steptoe, P.C., Edwards, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978, p. 366.
91. Šťastná, J., Sedláčková, M. Ultracytochemical demonstration of peroxidative activity of catalase in the cumulus cells of mouse cumulus-oocyte complexes. *Scripta Medica*, 1999, 72, s. 233 - 236.
92. Šťastná J., Sedláčková M., Žáková J. Differences in the occurrence of peroxisomes in human and mouse oocytes and their cumuli oophori. *Scripta Medica*, 2002, 75, s. 337.
93. Temple-Smith, P.D., Southwick, G.J., Yates, C.A. et al. Human pregnancy by IVF using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fertil Embryo Transf*, 1985, 2, p. 119-122.
94. Trávník, P., Čech, S., Leonov. B.V. et al. Výsledky a perspektivy oplození lidského vejce, jeho kultivace a transferu při léčbě tubární neplodnosti. *Scripta Medica*, 1982, 55, s. 243-244.

95. Trávník, P., Šťastná, J., Pilka, L., Soška, J. Možnosti testování kultivačních prostředí při IVF a ET. In: Nové směry v léčbě sterility, Sborník prací celost. Věd. konf., Brno, 1985, s. 68-69.
96. Trávník, P. Příprava vody pro kultivaci embryí, buněk a tkání. Autorské osvědčení ČSSR č. 257.098, Praha 1987.
97. Trávník, P., Tesařík, J., Šťastná, J. Medium pro oplození lidských vajíček a jejich kultivaci. Autorské osvědčení ČSSR č. 257.097, Praha, 1987.
98. Trávník, P., Hampl, A., Huttelová, R., Malenovská, A., Priesnitz, J., Rejthar, D., Žáková, J. Teoretická a praktická náplň oboru klinická embryologie. Čes Gynek, 2013, 78, 4, s. 400–401
99. Trávník P., Hüttelová R., Jelínková L. et al. Směrnice ke správné laboratorní praxi při asistované reprodukci - čistota prostředí. Čes Gyn, 2014, v tisku.
100. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature, 1983, 305, p. 707-709.
101. Tucker, M. J. Human oocyte and embryo cryopreservation. The Art and Science of Assisted Reproductive Techniques, Taylor Francis, London and New York, A Parthenon Book, 2004.
102. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Assisted Reproduction Technology Success Rates (2010), National Summary and Fertility Clinic Reports, December 2012 at <http://www.cdc.gov/art/ART2010>
103. Ventruba, P., Pilka, L., Čupr, Z., Trávník, P., Malenovská, A., Žáková, J. Oozytenentnahme in Verbindung mit Beckenmikrochirurgie. Zent bl Gynakol, 1991, 113, S. 557-561.
104. Ventruba, P., Čupr, Z., Pilka, L., Veselý, J., Rejdová, I., Žáková, J. Transvaginální odběr oocyty pod kontrolou vaginální sonografie: 1987 - 1990. Gynekolog, 1992, 1, s. 5-7.
105. Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J., Trávník, P., Komárková, J., Němcová, S.: Prolonged cultivation of human embryos: coculture on human tubal epithelia versus a synthetic medium. Proceedings of the IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, 1995, p. 429-433.
106. Ventruba, P., Žáková, J., Trávník, P., Adler, J. Závěrečná zpráva grantu IGA MZ ČR č. 1821-2: Asistovaná fertilizace-mikromanipulace v oblasti zona pellucida zvyšující úspěšnost oplození a transferu embrya. Brno, 1996, 94 s.
107. Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J. et al. Mikromanipulace v oblasti zona pellucida embrya: asistovaný hatching 1994 – 1995. Gynekolog, 1996, 5, s. 37–41.



108. Ventruba, P., Žáková, J., Trávník, P., Adler, J. Závěrečná zpráva grantu IGA MZ ČR č. 1820-2: Optimalizace in vitro fertilizace kokultivací embryí s lidskými tubárními epitelii. Brno, 1996, 122 s.
109. Ventruba, P., Žáková, J., Adler, J., Trávník, P., Komárková, J., Němcová, S. Prodloužená kultivace lidských embryí: srovnání kokultivace na lidských tubárních epitelích a kultivace v syntetickém médiu. Čes Gynek, 1996, 61, s. 27–33.
110. Ventruba, P., Žáková, J., Crha, I., Němcová, S. Intracytoplasmatická injekce spermie do oocyty a asistovaný hatching - mikromanipulační techniky zvyšující úspěšnost programu fertilizace in vitro. Prakt Gyn, 1997, 1, s. 14-25.
111. Vergouw, CG., Botros, LL., Roos, P., et al. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. Hum Reprod, 2008, 23, p. 1499–1504.
112. Vergouw CG., Kieslinger DC., Kosteljik H., et al. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. Hum Reprod, 2012, p. 1-8.
113. Vom, E., Roy, T.K., Brandi, S., Tappe, M.M. et al. Development of novel automated vitrification instrument; confirmation of ability to control critical parameters in a microfluidics consumable and software controlled instrument as part of vitrification. Hum Reprod, 2013, 28 (suppl 1): i112-i115 doi:10.1093/humrep/det204.
114. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. Fertil Steril, 2010, 93, 6:1921-8. Epub 2009 Feb 24.
115. Wetzels, A.M.M., Punt, A.P.E.M., Van der Zalm, Bastiaans, B.A. et al.: The effect of human skin fibroblast monolayers on human sperm motility and mouse zygote development. Hum Reprod, 1992, 7, p. 852-856.
116. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to – 196°C and – 289° C. Science, 1972, 178, p. 411- 414.
117. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. World Health Organisation, Cambridge University Press, 2010, ISBN 9789241547789.
118. Zeilmaker GH, Alberda A, Van Gent I. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril, 1984, 42, p. 293-296.
119. Žáková, J., Ventruba, P., Adler, J., Trávník, P. Kokultivace embryí s buňkami lidského vejcovodu v programu asistované reprodukce na I. gynek. porod. klinice v Brně. Gynekolog, 1995, 4, s. 124-127.
120. Žáková, J., Ventruba, P., Němcová, S. Assisted hatching - results in women with repeated embryotransfer failure. Proceedings of the IXth World Congress on IVF and Assisted Reproduction, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, 1995, p. 539-541.

121. Žáková J., Sedláčková M., Trávník P., Ventruba P. Morfologie buněk cumulus oophorus z komplexu oocyt-cumulus po oplození lidských oocytů in vitro. *Gynekolog*, 1996, 5, s. 209-212.
122. Žáková, J., Ventruba, P., Adler, J., Trávník, P., Němcová, S. Asistovaný hatching - přínosná mikromanipulační technika pro ženy s opakovaně neúspěšným embryotransferem. *Čes Gynek*, 1996, 61, s. 6–9.
123. Žáková, J., Ventruba, P., Trávník, P., Sedláčková, M. Závěrečná zpráva grantu IGA MZ ČR č. 2703-2 Vztahy mezi buňkami cumulus oophorus a časným embryem při kultivaci in vitro. Brno, 1997, 71 s.
124. Žáková, J., Sedláčková, M., Ventruba, P., Trávník, P. Vliv ultrastruktury spermií na výsledek fertilizace in vitro. *Čes Gynek*, 1997, 62, s. 3-6.
125. Žáková, J., Ventruba, P., Petrenko, M., Višňová, H., Pelíšková, L. Factors influencing effectiveness of cryopreserved /thawed embryo transfer. *Scripta Medica*, 1998, 71, 1, p. 49-56.
126. Žáková, J. Vztahy mezi buňkami cumulus oophorus a lidským oocytem v průběhu fertilizace in vitro. Disertační práce k získání vědecké hodnosti Ph.D., Brno, 2000. 69 s.
127. Žáková, J., Šťastná, J., Ventruba, P., et al. Závěrečná zpráva grantu IGA MZ ČR č. 5164-3: Identifikace peroxisomů a jejich úloha v eliminaci poškození lidských zárodečných buněk kyslíkovými radikály při in vitro fertilizaci. Brno 2002, 48 s.
128. Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Lousová, E. Sperm Donation Programme at the Centre of Assisted Reproduction in Brno: 1995 – 2005 results. *Scripta Medica Brno*, 2005, p. 323-328.
129. Žáková, J., Ventruba, P., Crha, I., Bulínová, E., Lousová, E. Možnost využití darovaných gamet nebo embryí při léčbě neplodnosti. *Prakt Gyn*, 2006, 3, s.105–107.
130. Žáková, J., Lousová, E., Crha, I., Ventruba, P., Pohanka, M., Nentwichová, P., Pochopová, H. PICSI – selekce zralých spermií pro oplození lidských oocytů metodou ICSI. *Prakt Gyn*, 2010, 14, 4, s. 180-182.
131. Žáková, J., Ventruba, P., Lousová, E., Crha, I., Hudeček, R. Kryokonzervace buněk a tkání v asistované reprodukci. *Prakt Gyn*, 2011, 15, 1, s. 16–21.
132. Žáková J, Ventruba P, Crha I, Lousová E, Sochorová K, Pohanka M, Huser M. Nové metody zvyšující úspěšnost asistované reprodukce. *Čes Gynek*, 2012, 77, 2, s. 139-142.
133. Žáková, J., Sedláčková, M., Polak, S., Dumková, J., Ventruba, P., Crha, I. Methods for preserving fertility in young women suffering from cancer: some aspects of ovarian tissue cryopreservation. *Bratisl Med J*, 2012, 113, 3, p.192-194.

134. Žáková, J., Trávník, P., Malenovská, A., Hüttelová, R. Činnosti a odpovědnosti pracovníků embryologické a andrologické laboratoře v centrech asistované reprodukce, Čes Gynek., 2013, 78, 5, s. 481-484.
135. Žáková, J., Lousová, E., Ventruba, P., Crha, I., Pochopová, H., Vinklárková, J., Tesařová, E., Nussir, M. Sperm cryopreservation before testicular cancer treatment and its subsequent utilization for the treatment of infertility. The Scientific World Journal, 2014, article ID 575978, 5 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/575978>.



## J. SOUHRN

Habilitační práce na téma „Vývoj a podíl klinické embryologie v programu asistované reprodukce“ je zpracována formou komentovaného souboru 23 publikovaných prací autorky.

Cílem práce je podat **přehled o nejvýznamnějších metodách a technikách klinické embryologie**, jejichž zavádění, rozvoj a praktické využití autorka sama v embryologické laboratoři prováděla. Práce vychází z publikací a z výsledků desítky grantových úkolů, řešených na jednotlivá témata na pracovišti asistované reprodukce Gynekologicko – porodnické kliniky LF MU a FN Brno.

Úvodní kapitola přináší základní informace o úloze klinické embryologie v asistované reprodukci a o rozvoji laboratorních metod a technik od 90. let 20. století. Na počátku každé kapitoly je uveden stručný přehled o daném tématu a poté vlastní příspěvek autorky k dané problematice.

V kapitole 1. „**Kultivace gamet a embryí**“ jsou komentovány 4 práce. Jsou uvedeny způsoby hodnocení kultivačních podmínek na základě studia ultrastruktury kumulárních buněk a spermií. Dále je popsán vývoj metod prodloužení délky kultivace embryí in vitro za hranici 48 hodin. Od roku 1993 jsme **prodloužili kultivaci až na 120 hodin** a dosáhli **poprvé stádia blastocysty** společnou kultivací embryí, tzv. kokultivací, s lidskými ovidukálními buňkami. Prodloužená kultivace v syntetických médiích se stala naší každodenní praxí a je prováděna v 98,5 % výkonů IVF.

V kapitole 2. „Mikromanipulační techniky“ je komentováno 5 publikací, které podávají přehled o zavádění mikromanipulačních technik a jejich současném využití v asistované reprodukci. Od roku 1994 provádíme techniku, která napomáhá uvolnění embrya ze zona pellucida a tím jeho implantaci, tzv. **asistovaný hatching**. Metoda **intracytoplazmatické injekce spermie do oocyту** (ICSI) se stala na našem pracovišti od roku 1996 nejprínosnější a nejpoužívanější mikromanipulační technikou pro oplozování oocytů. V současné době provádíme ICSI ve více než 90 % výkonů AR ročně. S použitím této techniky souvisí popsané metody pro získání spermií z epididymální (**MESA**) a testikulární tkáně (**TESE**) a při retrográdní ejakulaci.

V kapitole 3. „**Kryokonzervace gamet, embryí a zárodečných tkání**“ je komentováno celkem 11 prací. Zabývají se zaváděním a využitím kryokonzervace spermií, oocytů a embryí při léčbě neplodnosti. Kryokonzervaci spermií provádíme **od roku 1991** a mrazení embryí jsme zavedli v roce 1995. Dobře fungující kryokonzervace je základním předpokladem pro **program dárcovství gamet a embryí**. V rámci center asistované reprodukce máme první a největší spermabanku v ČR. Vybudovali jsme také **Centrum pro ochranu fertility** pro onkologicky nemocné muže a ženy. Mrazení spermatu nebo ovariální tkáně před gonadotoxickou léčbou jsme začali provádět jako první centrum v ČR a máme s ním největší zkušenost.

V kapitole 4. „**Hodnocení kvality gamet a embryí**“ jsou komentovány 3 publikace. Jsou uvedeny způsoby hodnocení kvality oocytů, spermií a embryí. Možnost hodnocení zralosti, jako dalšího parametru kvality spermií je podstata **metody PICS**I (Preselected sperm for IntraCyttoplasmic Sperm Injection). Pro oplozování jsou zralé spermie předem vybrány. Metodu jsme **zavedli v roce 2010** a pacienti ji volí v 71,5 % případů mikromanipulačního oplozování oocytů. Výběr embryí na základě neinvazivního kontinuálního monitoringu embryonálního vývoje pomocí **Primo Vision Systému** jsme zavedli do praxe **v roce 2011**. Kontinuálním snímáním vývoje embryí dostáváme přesné informace o pravidelnosti dělení buněk a dynamice vývoje v čase.

Centrum asistované reprodukce GPK LF MU a FN Brno a jeho embryologická laboratoř bylo 1. pracovištěm asistované reprodukce v České republice. Autorka je vedoucí embryologické a andrologické laboratoře tohoto pracoviště, které patří po celou dobu k předním centrům asistované reprodukce v ČR a ve světě. Pracoviště poskytuje klientům celou šíři metod a jeho výhodou je, že jde o univerzitní centrum s kompletním klinickým zázemím, možností mezioborové spolupráce a zkušeným týmem odborníků.

## K. SUMMARY

The habilitation thesis on the topic "Development and the Role of Clinical Embryology in the Assisted Reproduction Program" is based on the set of author's 23 commented papers supplemented with further commentaries. The aim of this work is **to provide an overview of the most important methods and techniques of clinical embryology**, where the author was personally engaged with implementation, development and practical use in the embryological laboratory. This work is based on the author's publications and the results of grant research on individual topics, in the Assisted Reproduction Center of the Obstetrics and Gynaecology Clinic of Masaryk University's Medical Faculty and Faculty Hospital Brno.

The introductory chapter provides basic information about the role of clinical embryology in assisted reproduction and the development of laboratory methods and techniques since the 1990s. The beginning of each chapter features a brief topical overview and is followed by author own contribution to the subject.

In chapter 1. "**The Cultivation of Gametes and Embryos**" 4 publications are commented. This chapter describes the ways of the cultivation conditions evaluation on the basis of the cumular cells and sperm ultrastructure study. Development of methods to extend length of the in vitro embryo cultivation beyond 48 hours is also described. Since 1993, we have **extended this cultivation up to 120 hours**, and for the first time, we have achieved for the first time **the blastocyst stage embryo**, due to the co-culture with human oviductal cells. Extended cultivation in the synthetic media has become our daily practice and is performed in 98.5 % of IVF procedures.

In chapter 2. "Micromanipulation Techniques" 5 publications are discussed which provide overviews of the implementation of micromanipulation techniques and their current use in assisted reproduction. Since 1994 we have provided a technique that helps an embryo leave the zona pellucida and its implantation - **assisted hatching**. **Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)** into the oocyte has become the most beneficial and the most widely used technique for oocyte fertilization since 1996. Currently, ICSI is carried out in more than 90 % of the cycles



each year. This technique is related to established methods for obtaining sperm from epididymal (**MESA**) and testicular tissue (**TESE**) and retrograde ejaculation.

In chapter 3. "**Cryopreservation of Gametes, Embryos and Embryonal Tissues**" 11 papers are discussed dealing with the introduction and application of cryopreservation of sperm, oocytes and embryos in the treatment of infertility. We have cryopreserved sperm **since 1991** and we introduced embryo freezing in 1995. Well-functioning cryopreservation is an essential prerequisite for a **donation of gametes and embryos program**. Within the center of assisted reproduction, we have the first and the largest sperm bank in the Czech Republic. We have also built a **centre for fertility preservation** of both male and female oncologic patients. As a first center in the Czech Republic, we have started to perform ovarian tissue and sperm freezing before gonadotoxic treatment and we have become quite experienced with this procedure.

Three publications are commented in chapter 4. entitled "**Evaluation of the Quality of Gametes and Embryos**", where we describing the procedures for quality evaluation of oocytes, sperm and embryos. The possibility of sperm maturity evaluation, as a successive quality parameter, is the base of the **PICSI method** (Preselected sperm for IntraCyttoplasmic Sperm Injection). Only pre-selected mature sperm are used for fertilization. We instituted this procedure in 2010, and patients choose this method in 71.5 % of oocyte insemination cases. In 2011, we began selecting embryos on the basis of non-invasive continuous monitoring of embryo development using the **Primo Vision System**. By continuously recording embryo development, we have received accurate information about the regularity of cell division and the dynamics of embryonic development.

This Center of Assisted Reproduction and its embryologic laboratory was the first workplace of assisted reproduction in the Czech Republic. The author of this thesis is a head of the center's Embryological and andrological laboratory, which is rated as one of the leading centers for assisted reproduction in the Czech Republic and world. This workplace offers clients an entire range of methods and as a part of a University Complex, the center features complete clinical facilities, interdisciplinary collaboration, and an experienced team of experts.