

Fyziologické principy léčebných metod v oblasti reprodukce

Prof. MUDr. Pavel Trávník, DrSc.

Obsah

- Úvod
- Stimulace nástupu puberty
- Antikoncepce
- Plodnost a její hodnocení
- Umělé oplodnění

Úvod k lekci



Sir Robert G. Edwards, nositel Nobelovy ceny

Motto:

Jakákoliv léčba poruch sexuálního vývoje, poruch plodnosti, zábrana početí apod. musí vycházet z fyziologických principů

Jde o složité procesy, které jsou vzájemně vysoce koordinované a nefyziologický zásah vede k neúspěchu nebo dokonce k poškození embrya nebo pacienta

Stimulace nástupu puberty

Stimulace nástupu puberty - úvod

Puberta jako předpoklad budoucího sexuálního života a reprodukce nemusí spontánně nastoupit v očekávané době, případně vůbec.

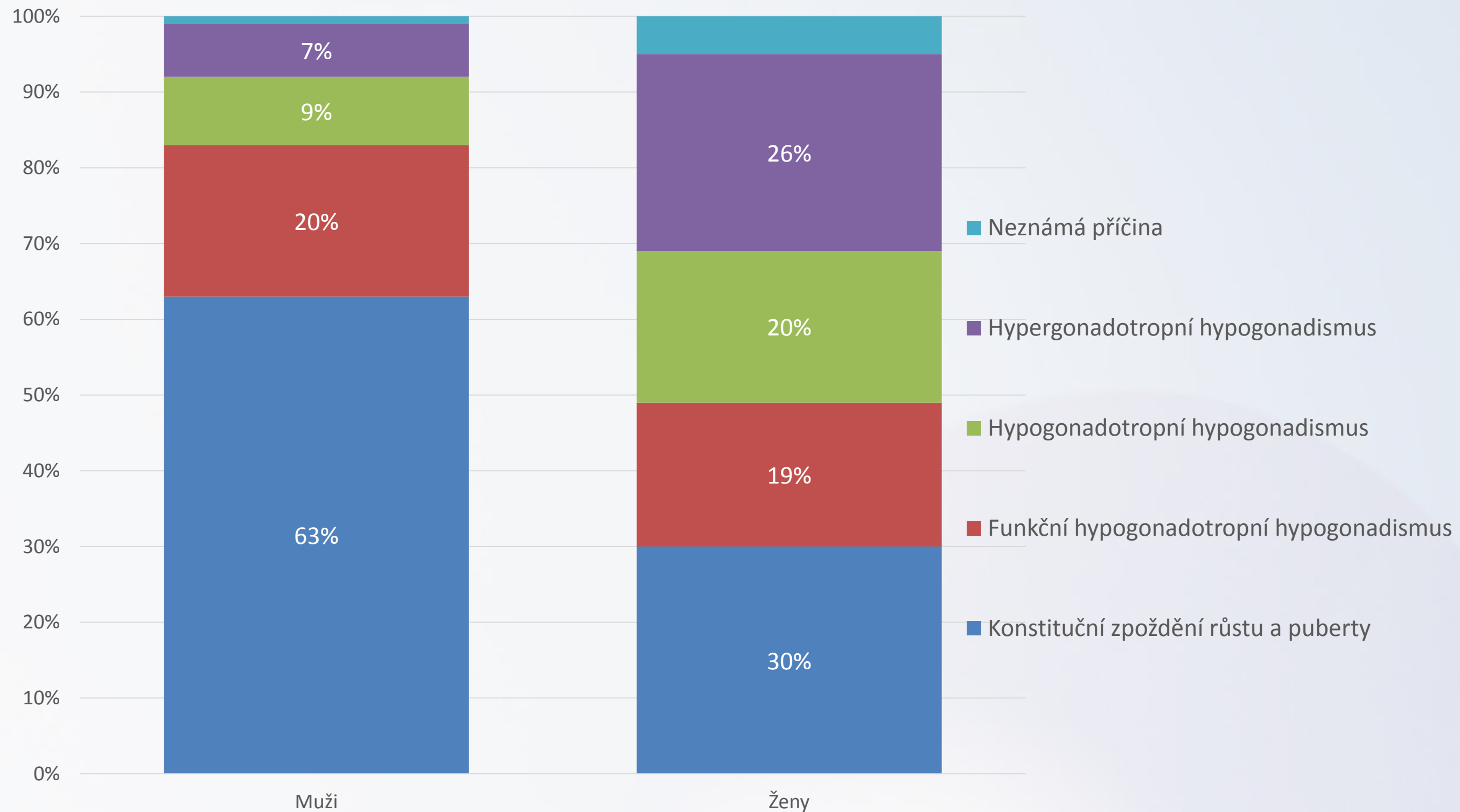
- Postihuje přibližně 2 % adolescentů.
- Nástup puberty je iniciován v hypotalamu, dalším stupněm procesu je adenohypofýza a pohlavní žlázy.
- Významnou roli hraje **kisspeptin**, **leptin**, **neurokinin B** a FSH s podporou růstového hormonu

Stimulace nástupu puberty – příčiny opožděné puberty

Příčiny opožděné puberty jsou:

- **Konstituční zpoždění růstu a puberty**
 - ❖ puberta spontánně většinou nastoupí, ale pozdě
 - ❖ dědičné faktory
 - ❖ chronická onemocnění (celiakie, zánětlivá onemocnění střev, ledvinová nedostatečnost, anorexie)
- **Funkční hypogonadotropní hypogonadismus (např. hypotyreóza)**
- **Hypogonadotropní hypogonadismus**
 - ❖ porucha na úrovni hypotalamu nebo hypofýzy, např. Kallmanův syndrom, mutace v genu KISS1 nebo KISS1R
- **Hypergonadotropní hypogonadismus**
 - ❖ porucha na úrovni pohlavních žláz (Turnerův syndrom, Klinefelterův syndrom, onkologická léčba)
- **Porucha syntézy nebo necitlivost k androgenům**

Stimulace nástupu puberty – příčiny opožděné puberty



Stimulace nástupu puberty – léčba opožděné puberty

Léčba:

- konstituční zpoždění růstu a puberty – opatrná substituce pohlavními hormony (riziko akcelerace kostního zrání), evtl. růstový hormon, inhibitory aromatázy (brání přeměně testosteronu na estradiol)
- hypogonadotropní hypogonadismus – substituce pohlavními hormony, případně GnRH nebo gonadotropiny, experimentálně analoga kisspeptinu
- hypergonadotropní hypogonadismus – substituce pohlavními hormony
- porucha syntézy androgenů – substituce pohlavními hormony

Antikoncepce

Antikoncepce - úvod

- Antikoncepce umožňuje regulaci porodnosti a plánování počtů dětí na vhodnou dobu.
- Vedlejším pozitivním účinkem některých forem antikoncepce je ochrana před nákazou pohlavními chorobami.
- Některé typy antikoncepce mají i protektivní účinek vůči některým nádorovým onemocněním.

Typy antikoncepce:

- Bariérová
- Spermicidní
- Intrauterinní tělíška
- Hormonální ženská
- Hormonální a farmakologická mužská

Antikoncepce - bariérová, spermicidní

- Bariérová antikoncepce je založena na mechanické zábraně průniku spermií do cervikálního kanálu
 - ❖ kondomy, pesary, femidomy
 - ❖ často mají spermicidní složku
- Spermicidní antikoncepce – používá látek, které spermie znehybní nebo ireverzibilně poškodí
 - ❖ kyselé prostředí
 - ❖ sloučeniny těžkých kovů
 - ❖ detergenty apod.

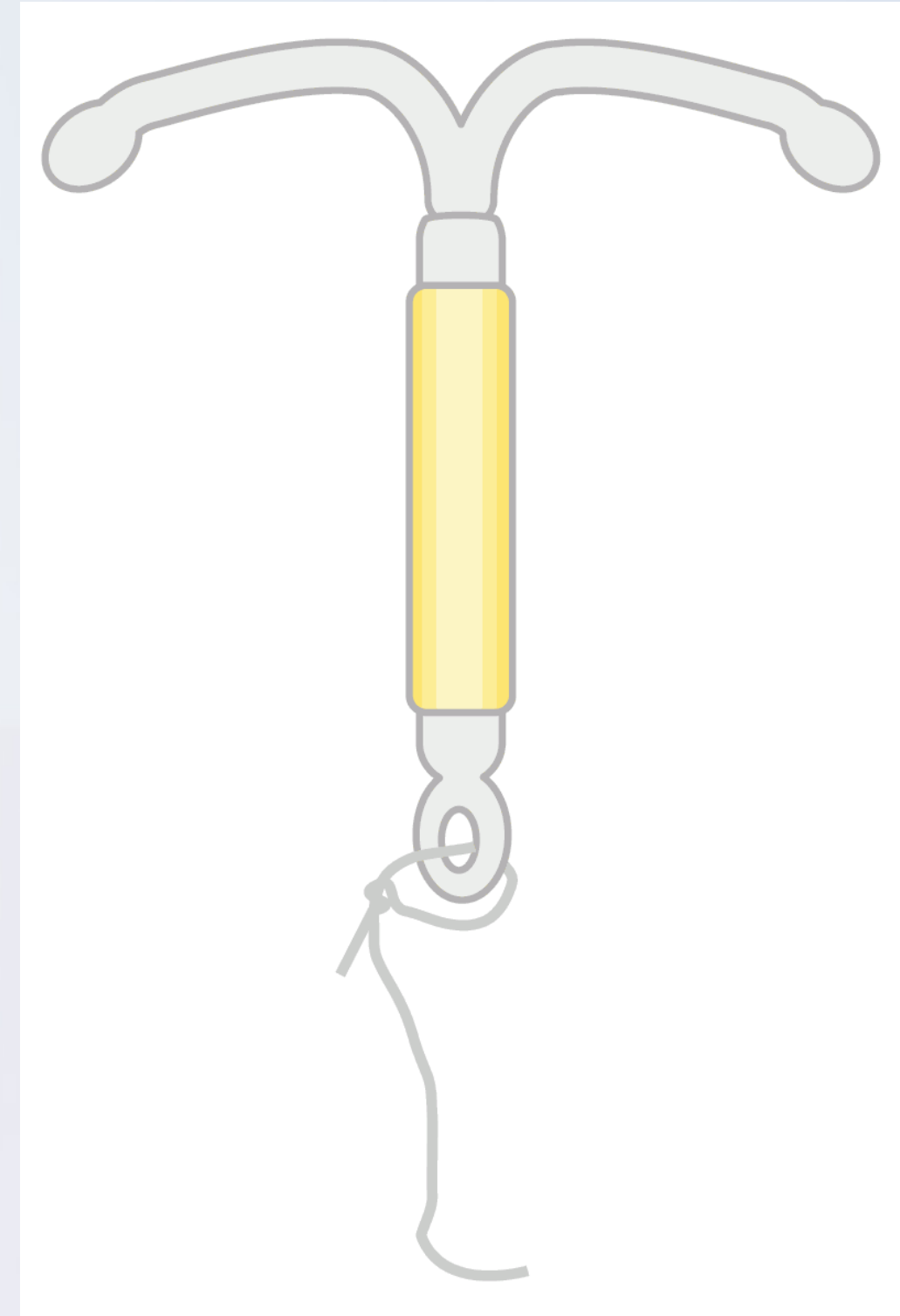
Antikoncepce - intrauterinní tělíska

- Intrauterinní tělíska (IUD) jsou různých tvarů a používají se:
 - ❖ k dlouhodobé (až 6 let) antikoncepci,
 - ❖ k antikoncepci emergentní (postkoitální, morning after).
- Samotné tělísko působí jako cizí těleso v děloze, vyvolává
 - ❖ imunitní reakci, zvyšuje se množství makrofágů a neutrofilních leukocytů v děložní dutině
 - ❖ změny v transkripci v endometriu – změna složení sekretu

Důsledek: **fagocytóza spermií, omezení schopnosti implantace**

Antikoncepce - intrauterinní tělíška dotovaná hormony

- Tělíška s hormonální složkou obsahují nejčastěji **levonorgestrel** (syntetický gestagen)
 - ❖ Lokální účinek gestagenu brání transformaci endometria a tím implantaci embrya
 - ❖ Zvyšuje viskozitu cervikálního hlenu (brání průniku spermií)
 - ❖ Snižuje motilitu vejcovodů



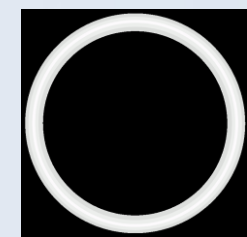
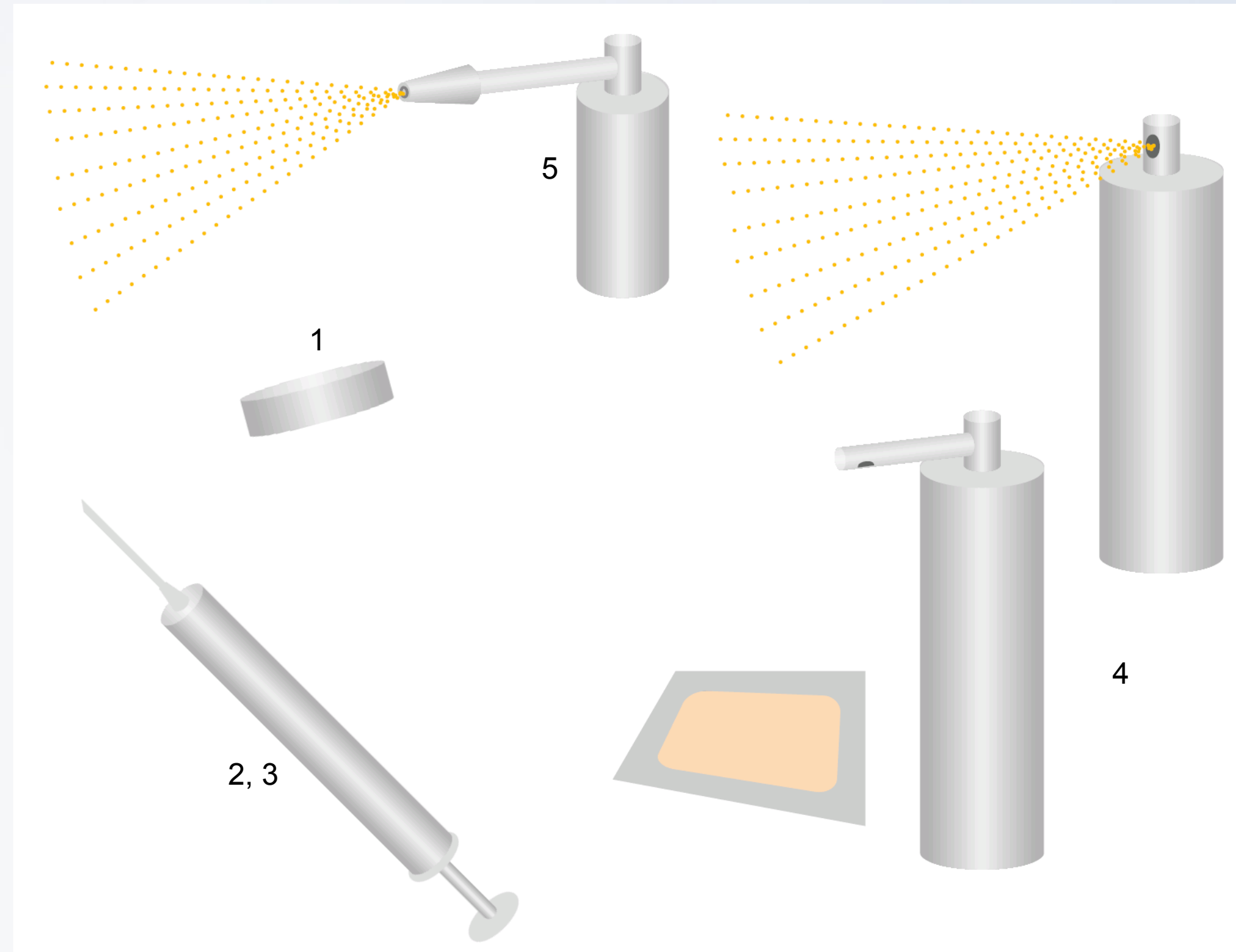
Antikoncepce - intrauterinní tělíška dotovaná mědí

- Tělíška dotovaná mědí (případně stříbrem)
 - ❖ Působí toxicky na spermie i časná embrya
 - ❖ Mají desinfekční účinek

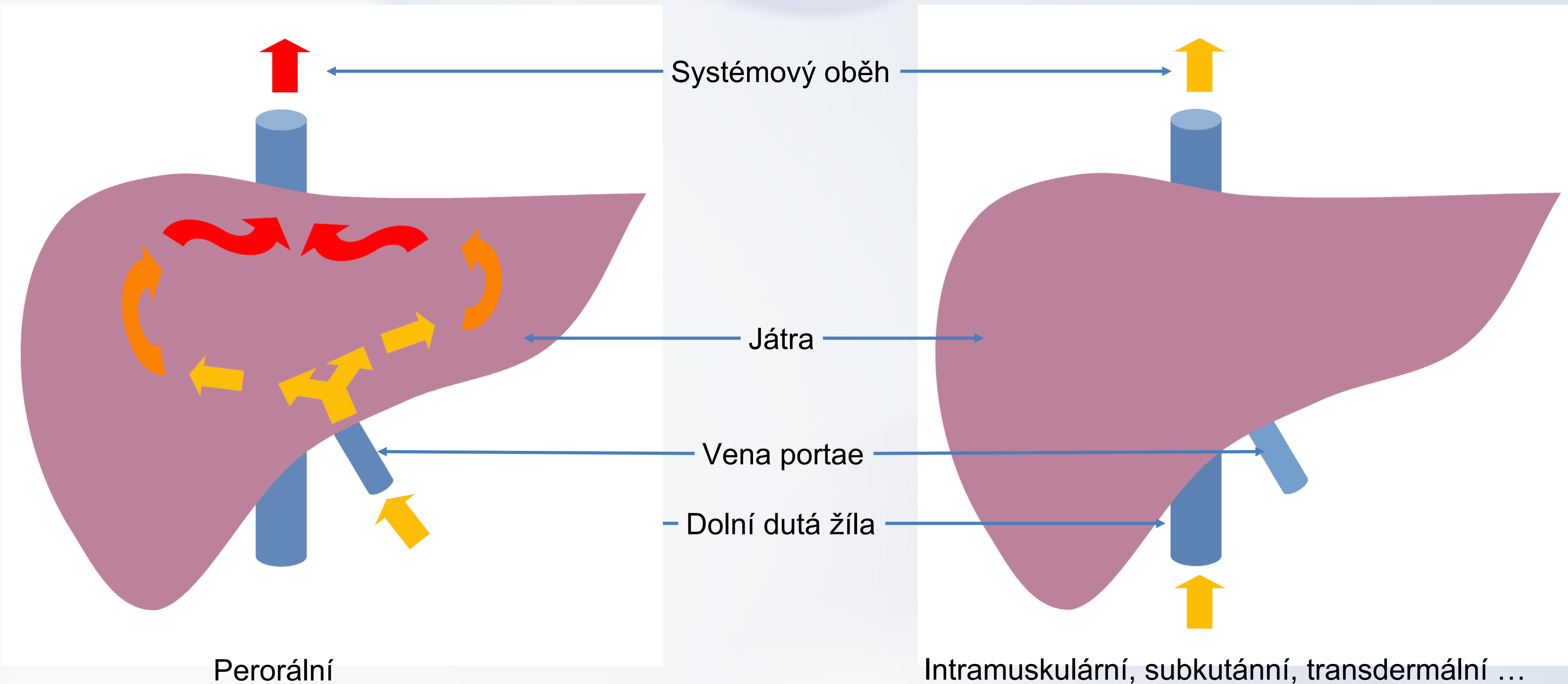


Antikoncepce – farmakologická / hormonální – způsob aplikace

1. Perorální
2. Intramuskulární
3. Subkutánní
4. Transdermální
5. Intranazální
6. Vaginální
7. Sublinguální



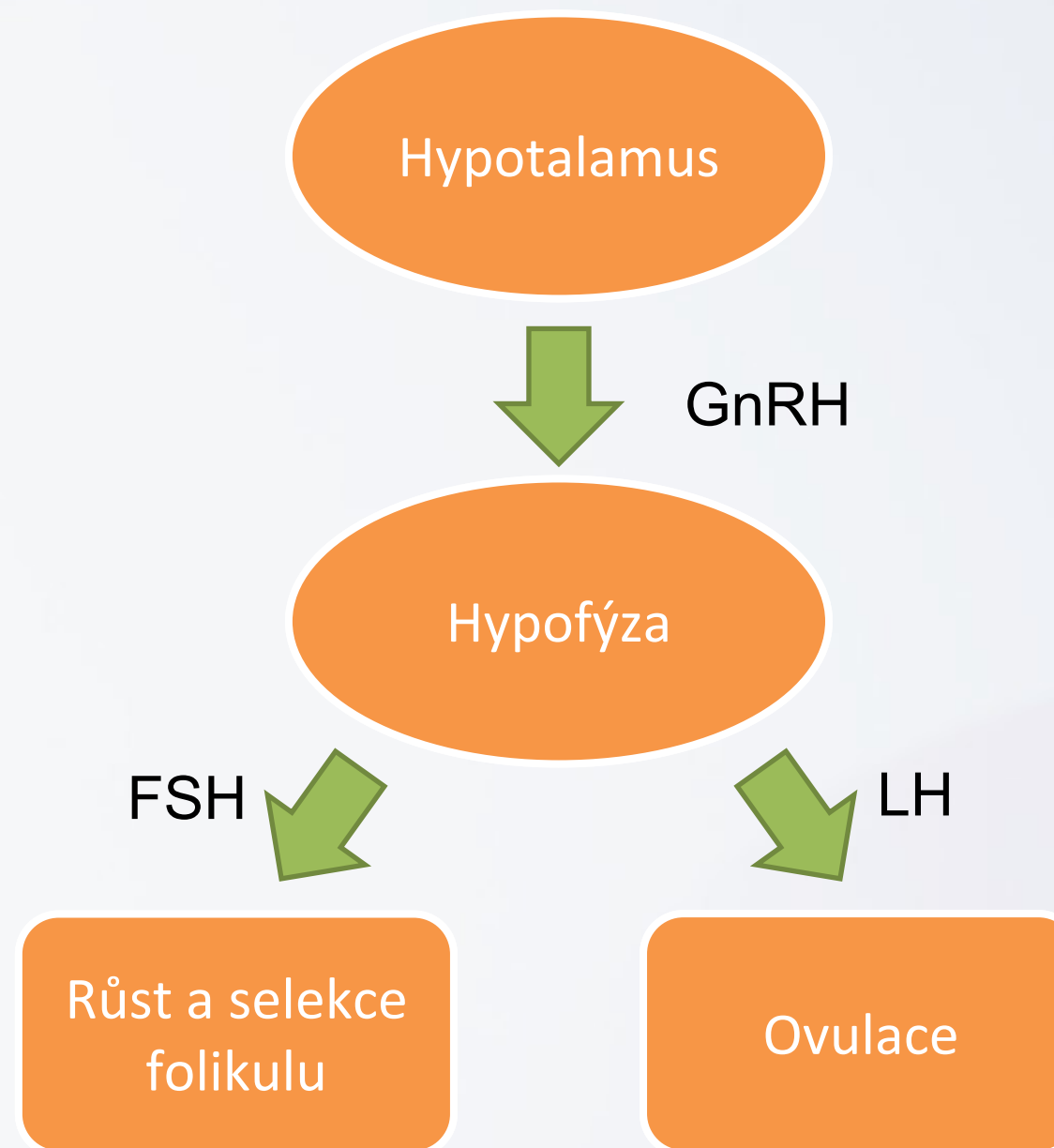
Antikoncepce – farmakologická / hormonální – metabolismus



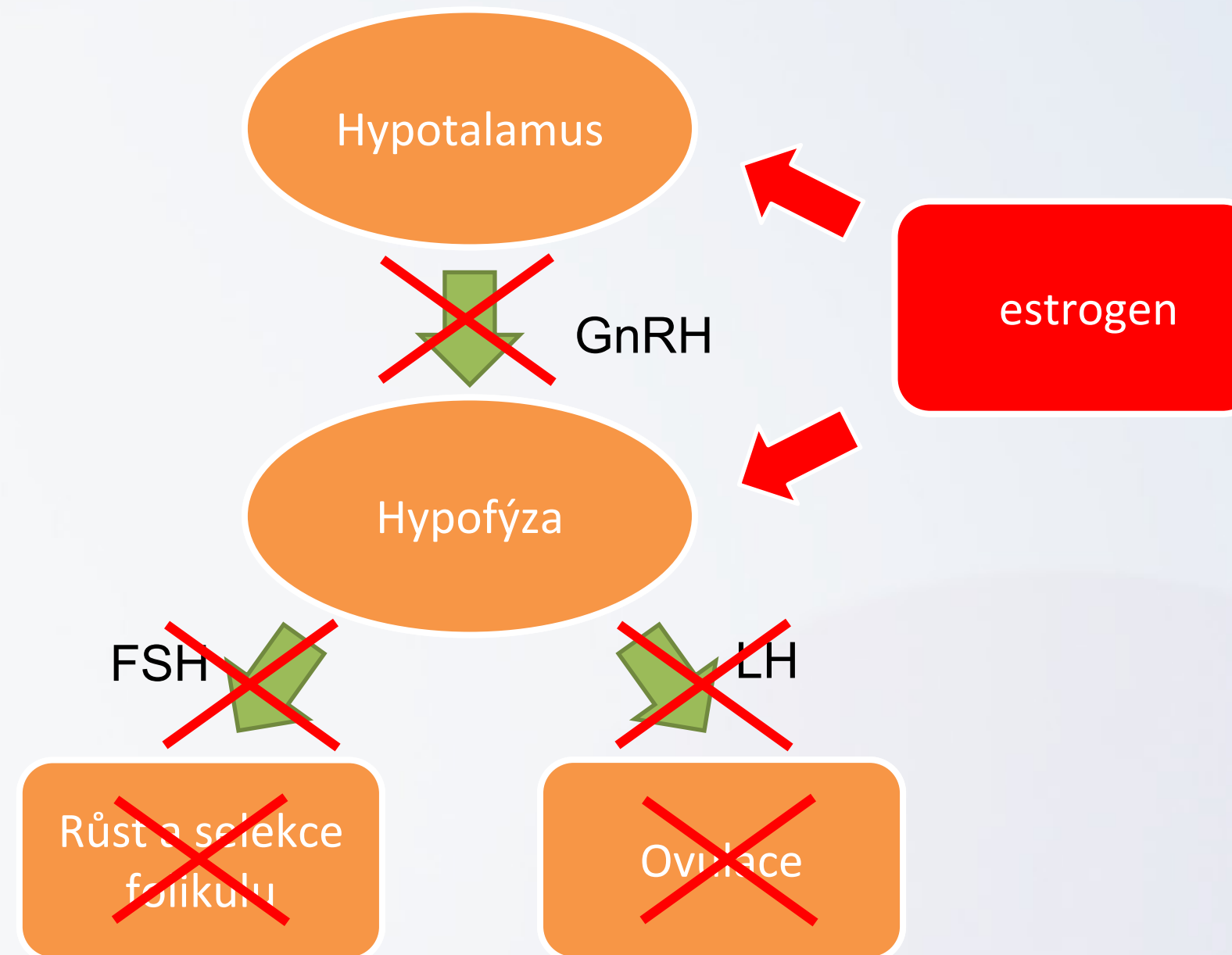
Antikoncepce – hormonální ženská

- Rozeznáváme pravidelnou a emergentní antikoncepci
- Pravidelná hormonální antikoncepce
 - ❖ jednosložková nebo kombinovaná (estrogeny, gestageny, estrogeny + gestageny)
 - ❖ přerušovaná (s menstruací) nebo kontinuální (bez menstruace)
 - ❖ bifázická (liší se složení v první a druhé polovině cyklu) nebo monofázická
 - ❖ je založena na zpětnovazebném ovlivnění sekrece FSH (brání vývoji ovariálních folikulů), ovlivnění složení cervikálního hlenu, pohyblivosti vejcovodů a řasinek a receptivity endometria.
- Emergentní antikoncepce se užívá po koitu, má dva základní principy:
 - ❖ Levonorgestrel – při včasném podání brání ovulaci potlačením sekrece LH (do 72 hodin)
 - ❖ Ulipristal – antagonist progesteronu – brání implantaci (do 120 hodin)

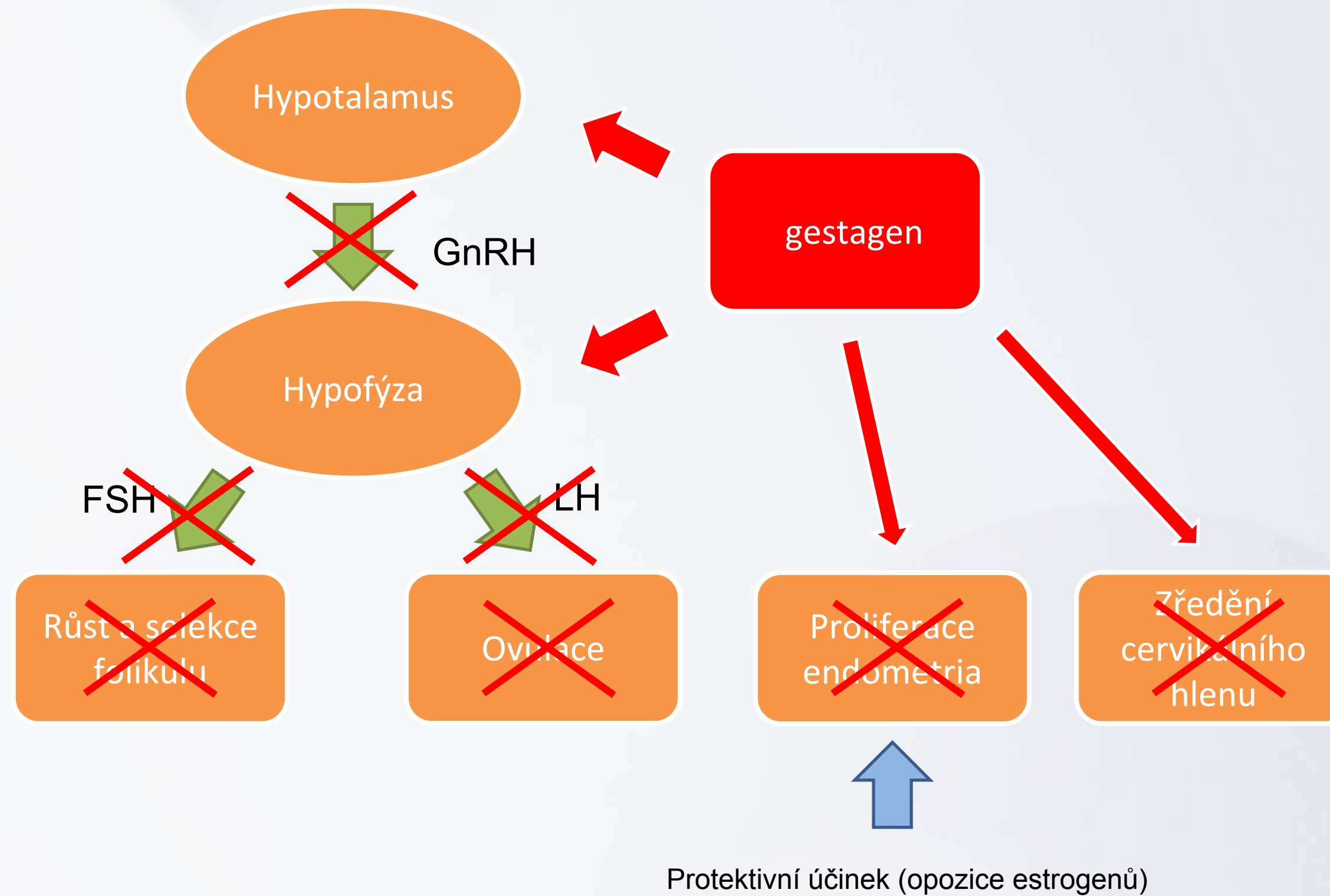
Antikoncepce – hormonální ženská



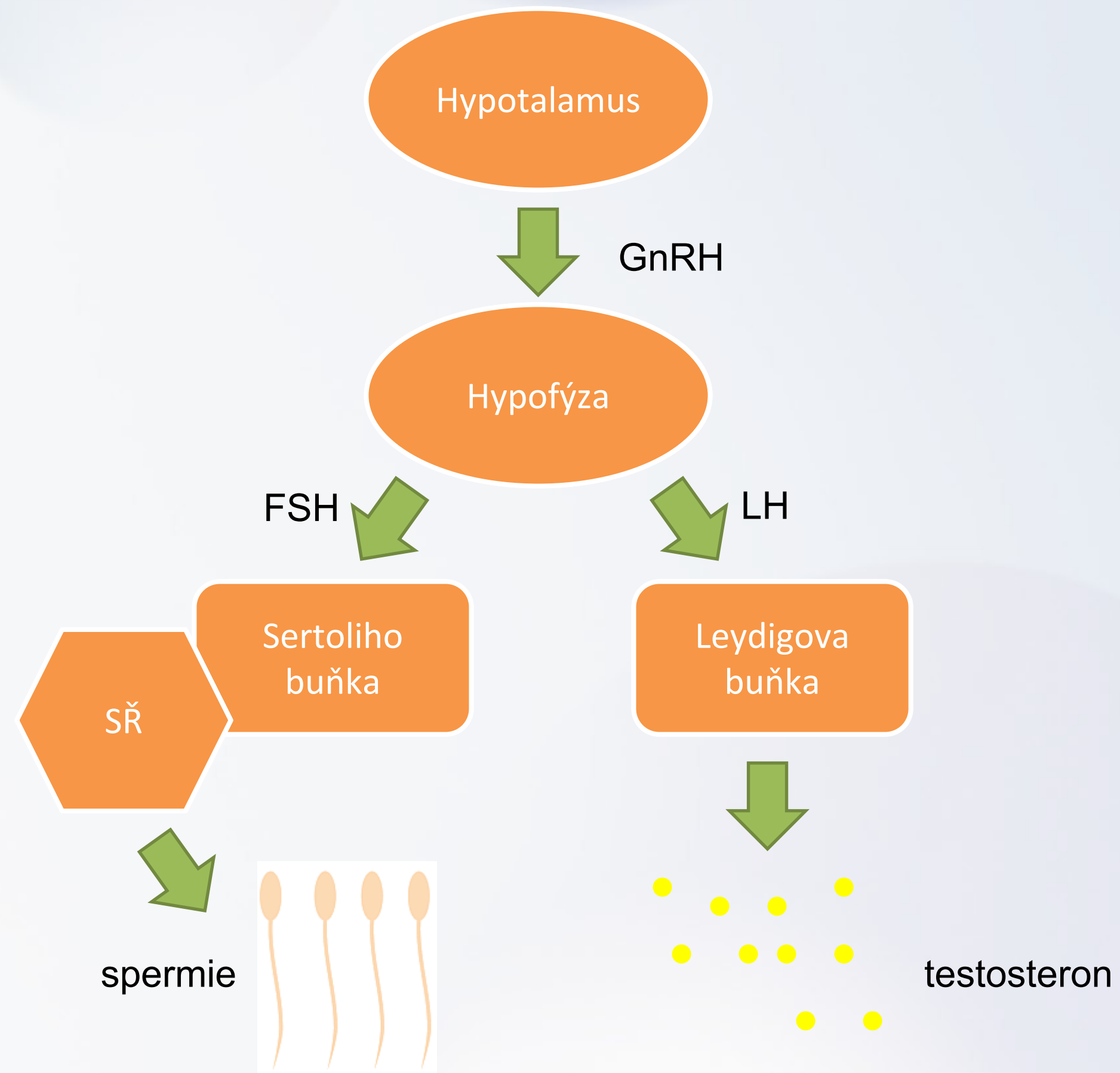
Antikoncepce – hormonální ženská - estrogeny



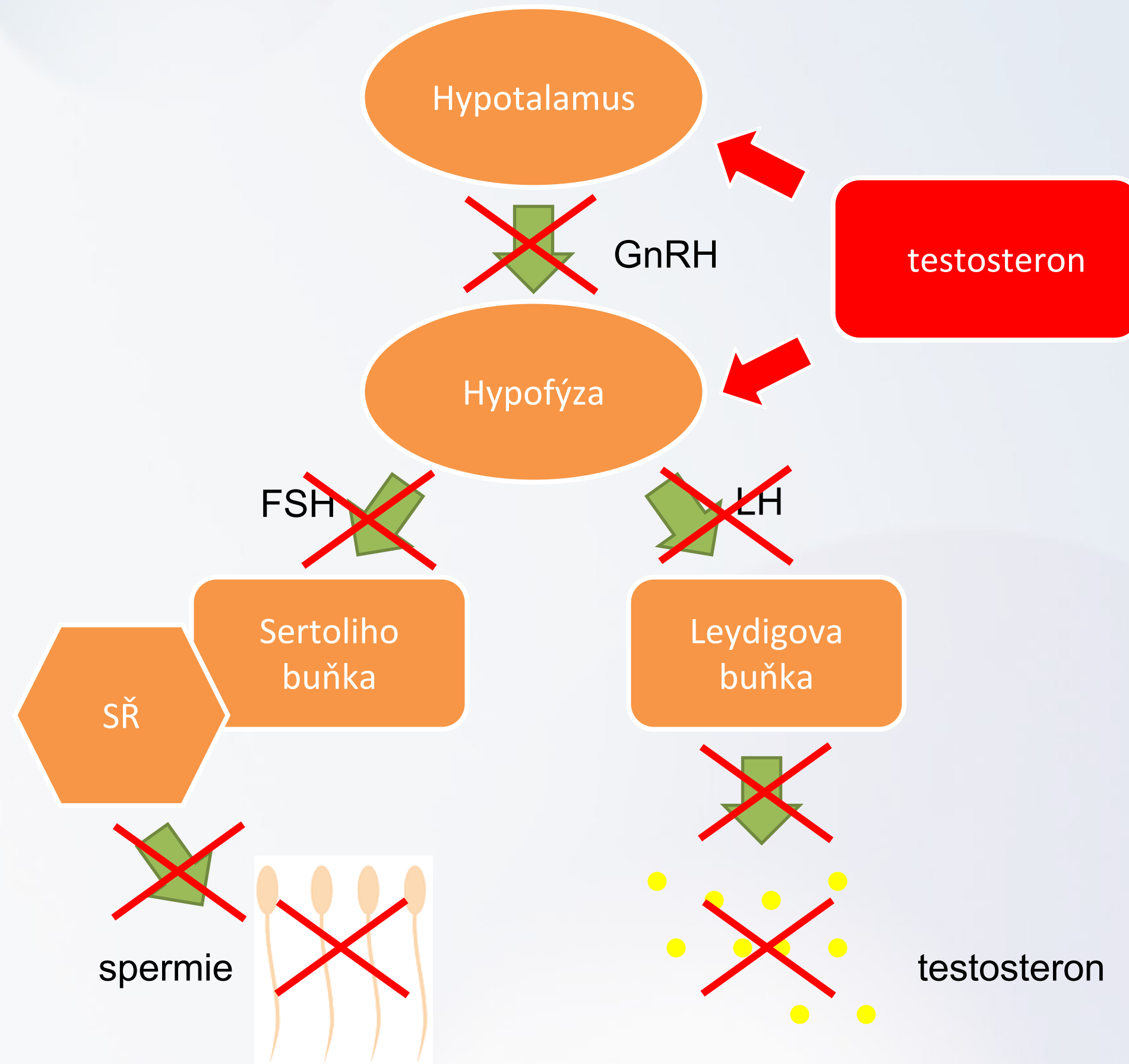
Antikoncepce – hormonální ženská - gestageny



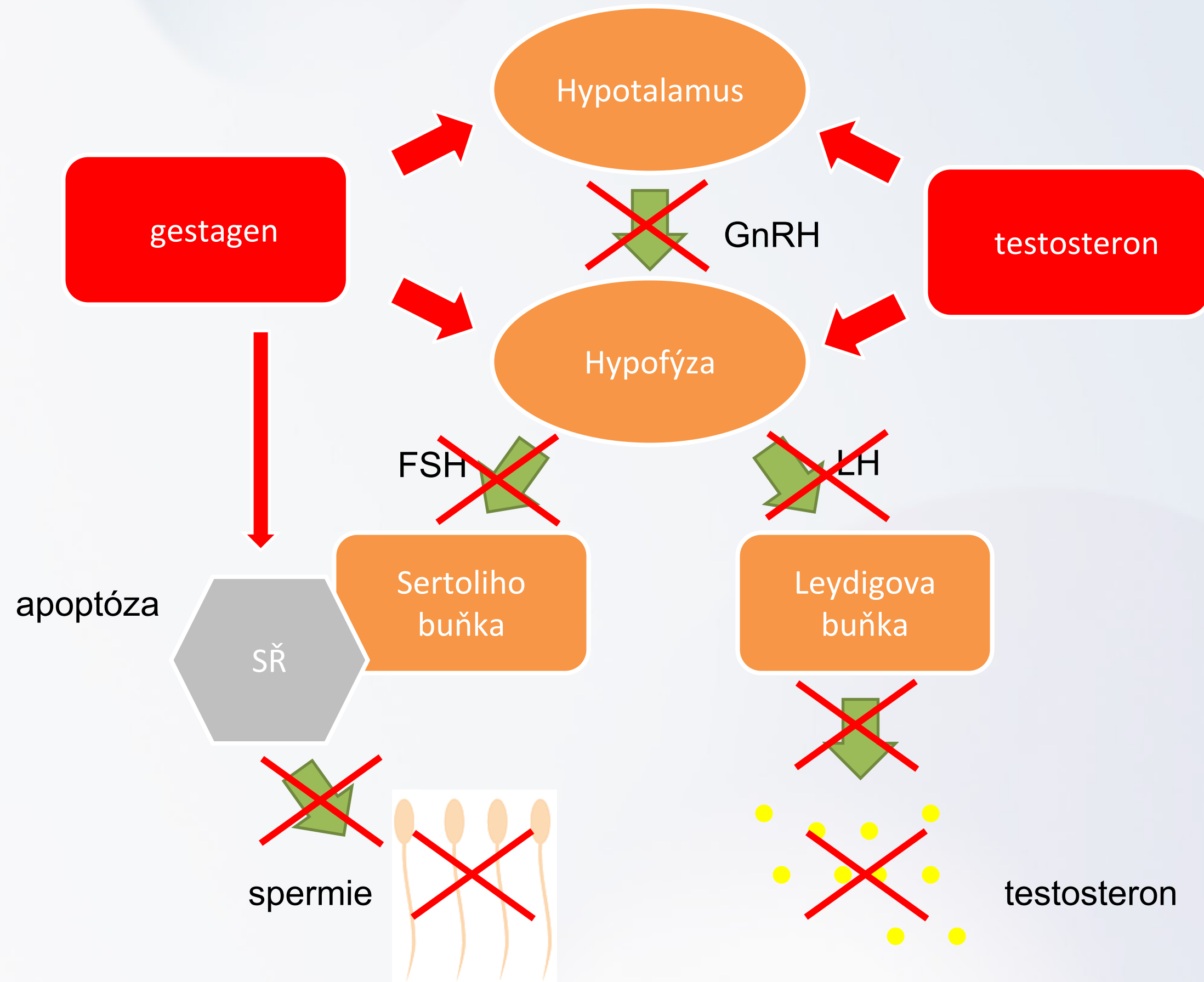
Antikoncepce – hormonální mužská



Antikoncepce – hormonální mužská



Antikoncepce – hormonální mužská kombinovaná

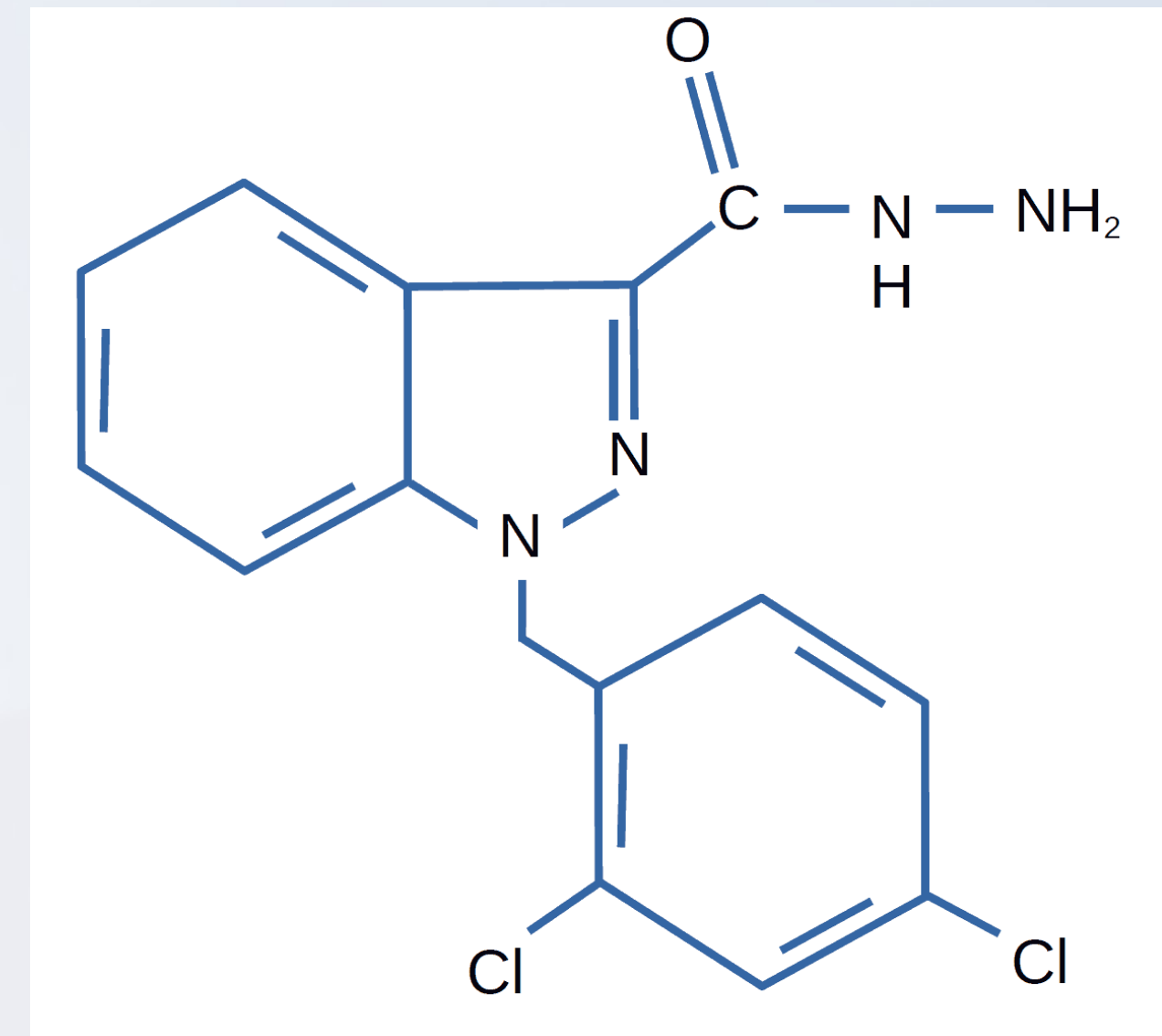


Antikoncepce – farmakologická mužská

- Už mnoho let je zkoumána možnost ovlivnit produkci nebo funkci spermií nehormonálním farmakologickým způsobem.
- Bylo vyzkoušeno několik látek, které vykazovaly antikoncepční účinek u experimentálních živočichů.
- Jejich použití je zatím experimentální, zejména vzhledem k možným nežádoucím vedlejším účinkům.

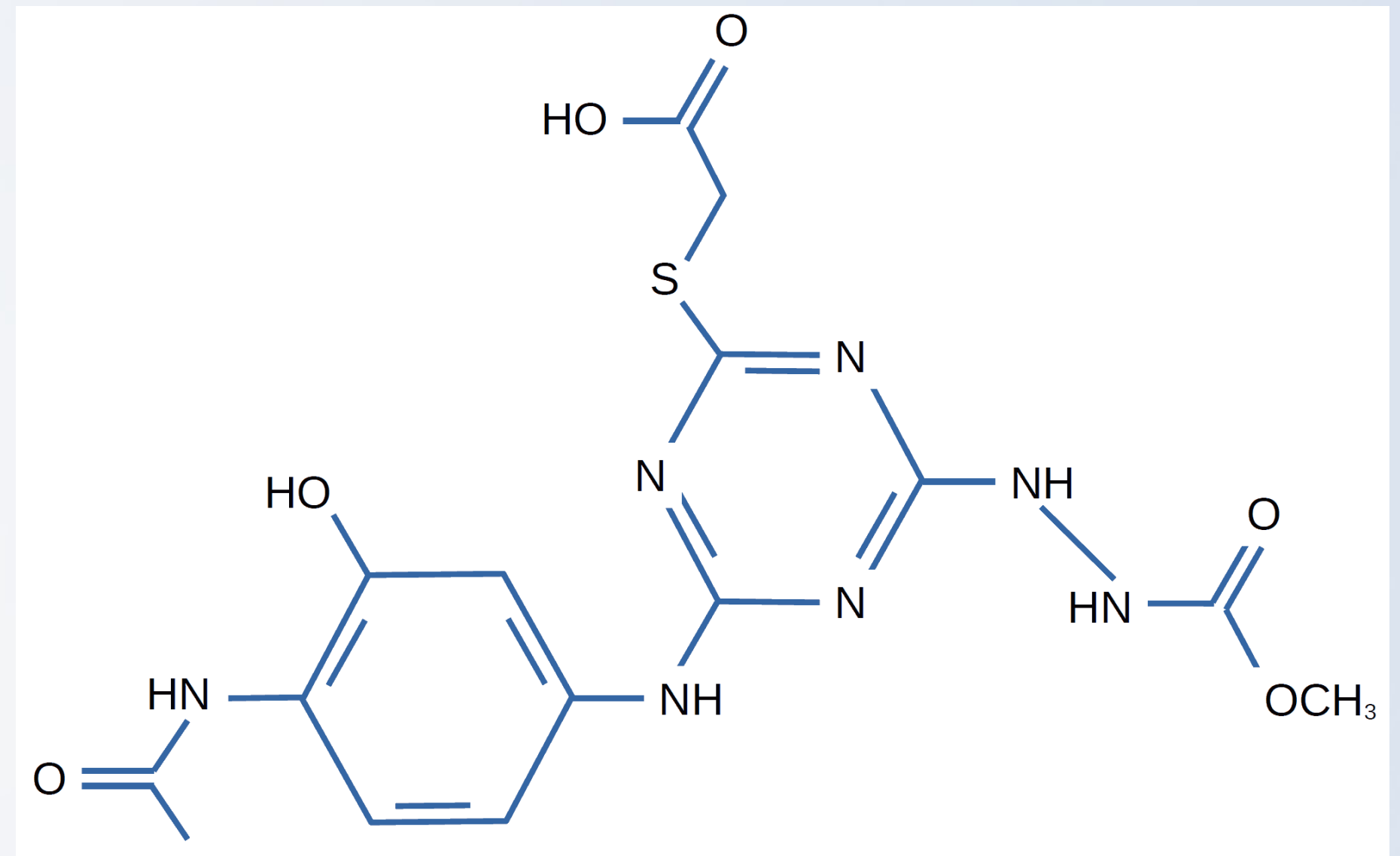
Antikoncepce – farmakologická mužská - adjutin

- 1-(2, 4-dichlorobenzyl)-1H-indazol-3-karbohydrazid
- Inhibitor mitochondriální hexokinázy
- Ruší spojení mezi Sertoliho buňkami a spermatidmi a poškozuje cytoskelet Sertoliho buněk – účinek reverzibilní?
- Vedlejší účinky – možné poškození jater a kosterních svalů



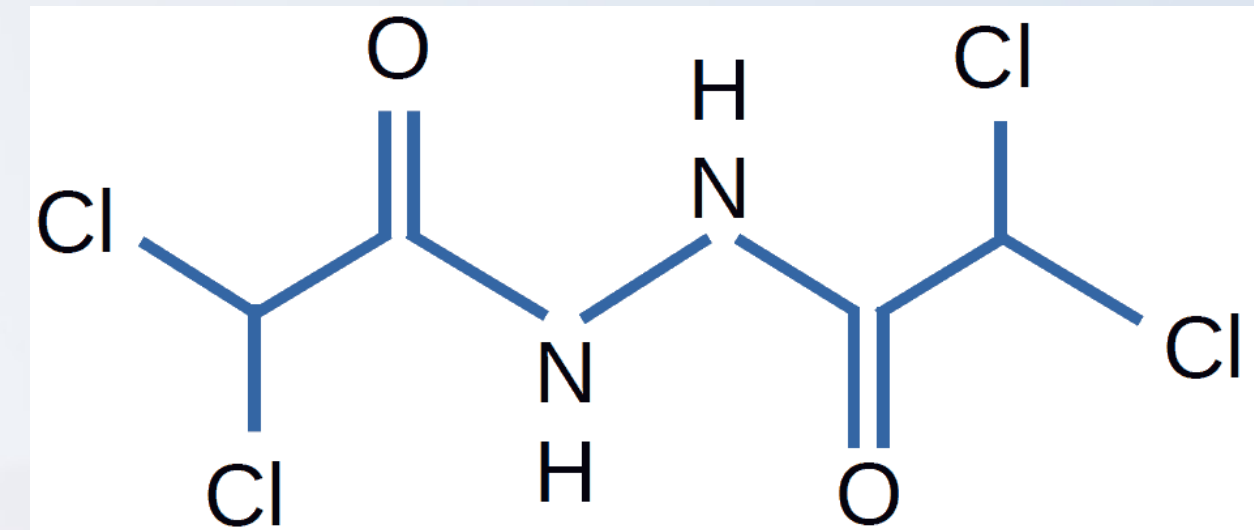
Antikoncepce – farmakologická mužská - inhibitory eppinu

- Eppin je povrchový protein spermií, fyziologicky se na něj váže semenogelin
- Sloučeniny vázající se na eppin zastavují pohyb spermií
- Látka EP055 má schopnost vázat se na eppin a znehybňovat spermie



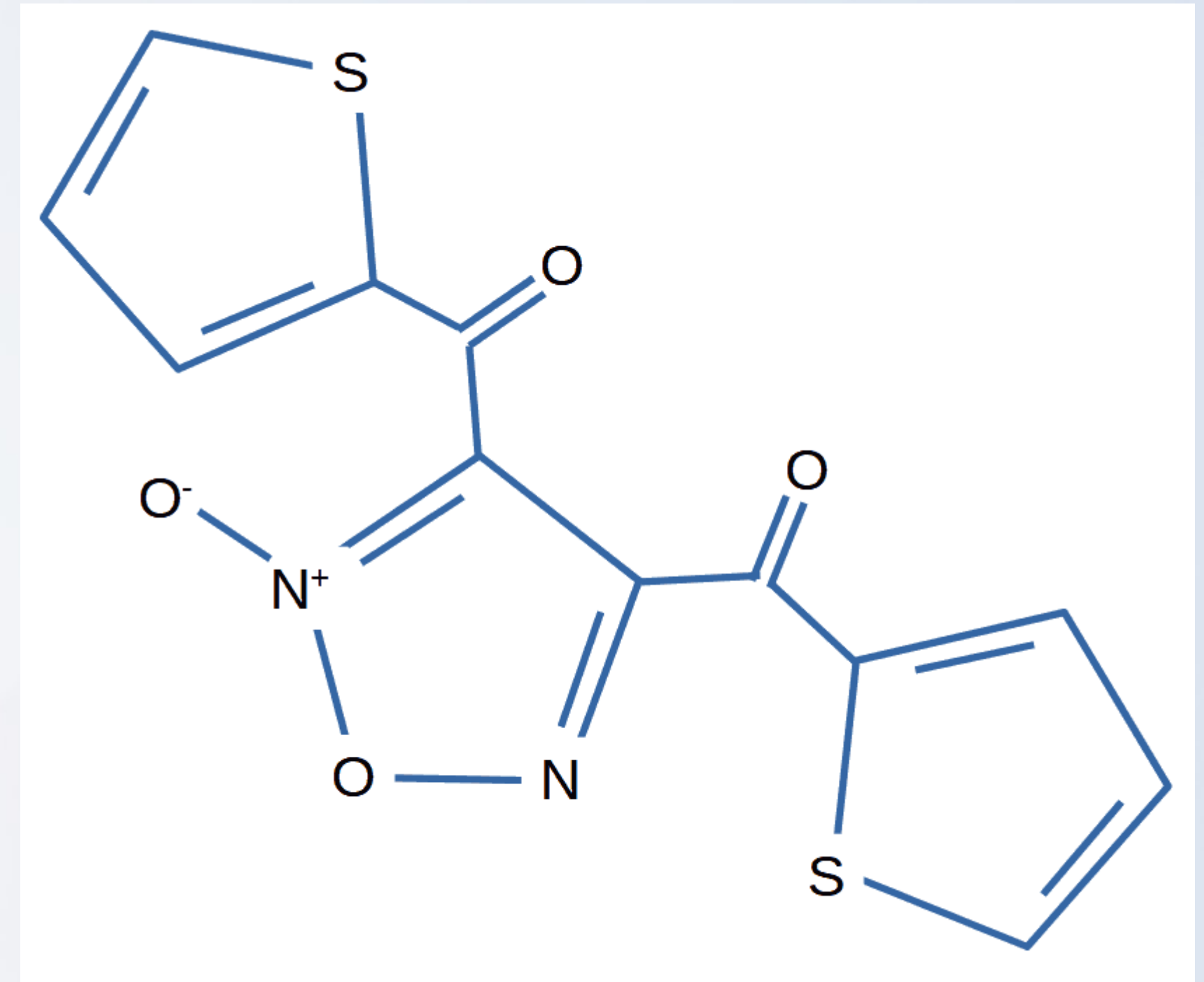
Antikoncepce – farmakologická mužská - inhibitory kyseliny retinové

- Kyselina retinová, derivát vitamínu A, je nezbytná pro spermatogenezi, umožňuje diferenciaci spermatogonií
- Bis(dichloroacetyl)diamin (WIN 18.446) blokuje syntézu kyseliny retinové z retinalu ve varlatech, cílí na aldehyddehydrogenázu 1A2
- Vedlejším účinkem je nevolnost a zvracení při požití alkoholu, riziko poškození nervů ...



Antikoncepce – farmakologická mužská - inhibitory CatSper

- Ionový kanál CatSper je nezbytný pro funkci spermií
- Jeho vysoce selektivním blokátorem je látka HC-056456 (3,4-bis(2-thienoyl)-1,2,5-oxadiazol-N-oxid)
- Významně ovlivňuje vstup Ca^{2+} do buněk, progresivní motilitu, fosforylaci proteinového tyrosinu, indukovanou akrozomovou reakci a hyperaktivaci, schopnost spermií oplodnit oocyty
- Vedlejší účinky?

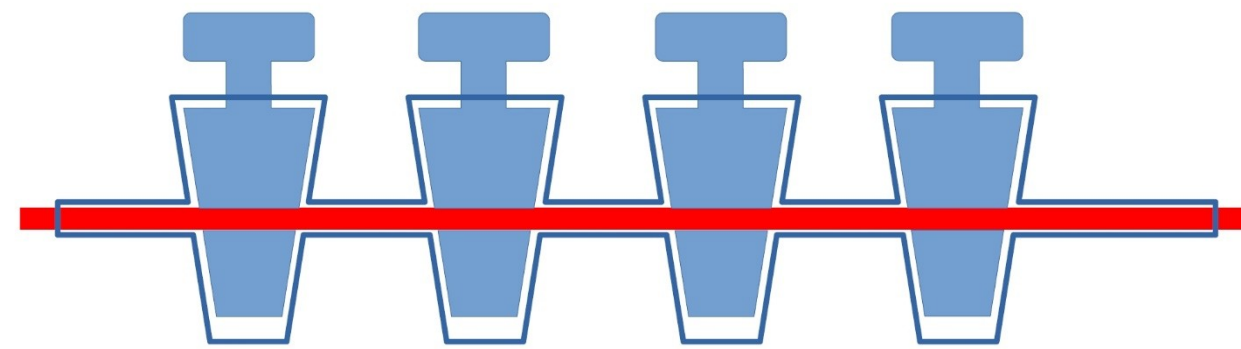


Plodnost a její hodnocení

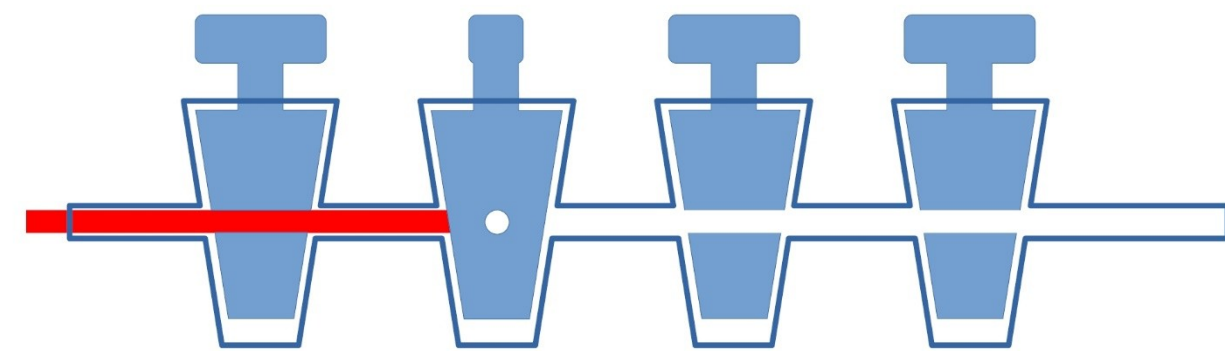
Plodnost a její hodnocení - úvod

- Plodnost v medicínském smyslu slova znamená schopnost počít dítě, které se narodí živé.
- Pokud dojde k oplození a těhotenství dále nepokračuje, jde rovněž o neplodnost, stejně jako když chybí schopnost oplození.
- Plodnost je definována pro pár, pouze v krajních případech můžeme prohlásit o jedinci, že je neplodný, ve většině případů je neplodnost důsledkem menších chyb v reprodukčním procesu, které se sumují nebo potencují.

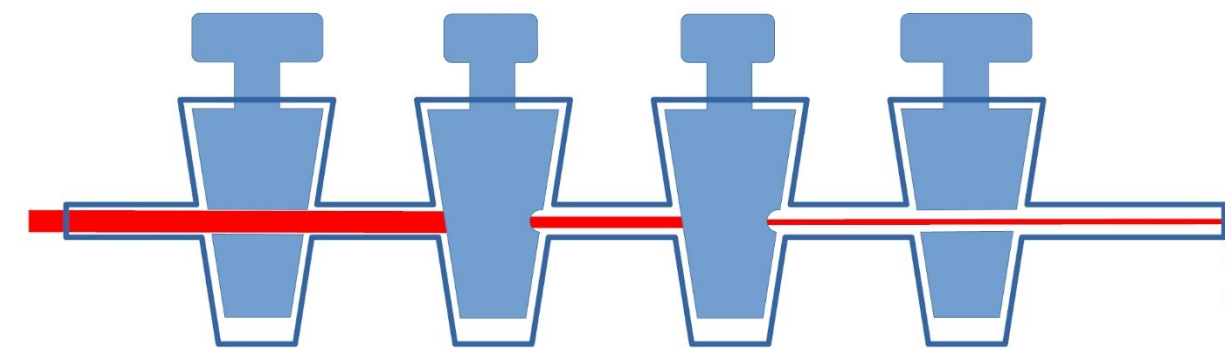
Plodnost a její hodnocení – kumulace příčin



Plodný pár



Jedna zásadní příčina poruchy plodnosti



Kumulace překážek

Plodnost a její hodnocení – příčiny poruch

Muž

- Spermatogeneze
- Zrání spermií v nadvarleti
- Kvalita spermií
- Transport spermií pohlavními cestami
- Erekcce
- Ejakulace

Žena

- Kvalita oocytů
- Folikulogeneze
- Ovulace
- Transport oocytu a embrya
- Prostředí vejcovodu a děložní prostředí
- Receptivita endometria
- Schopnost donosit plod

Pár

- Nekonzumovaný sex
- Genetická inkompatibilita

Plodnost a její hodnocení – ejakulát

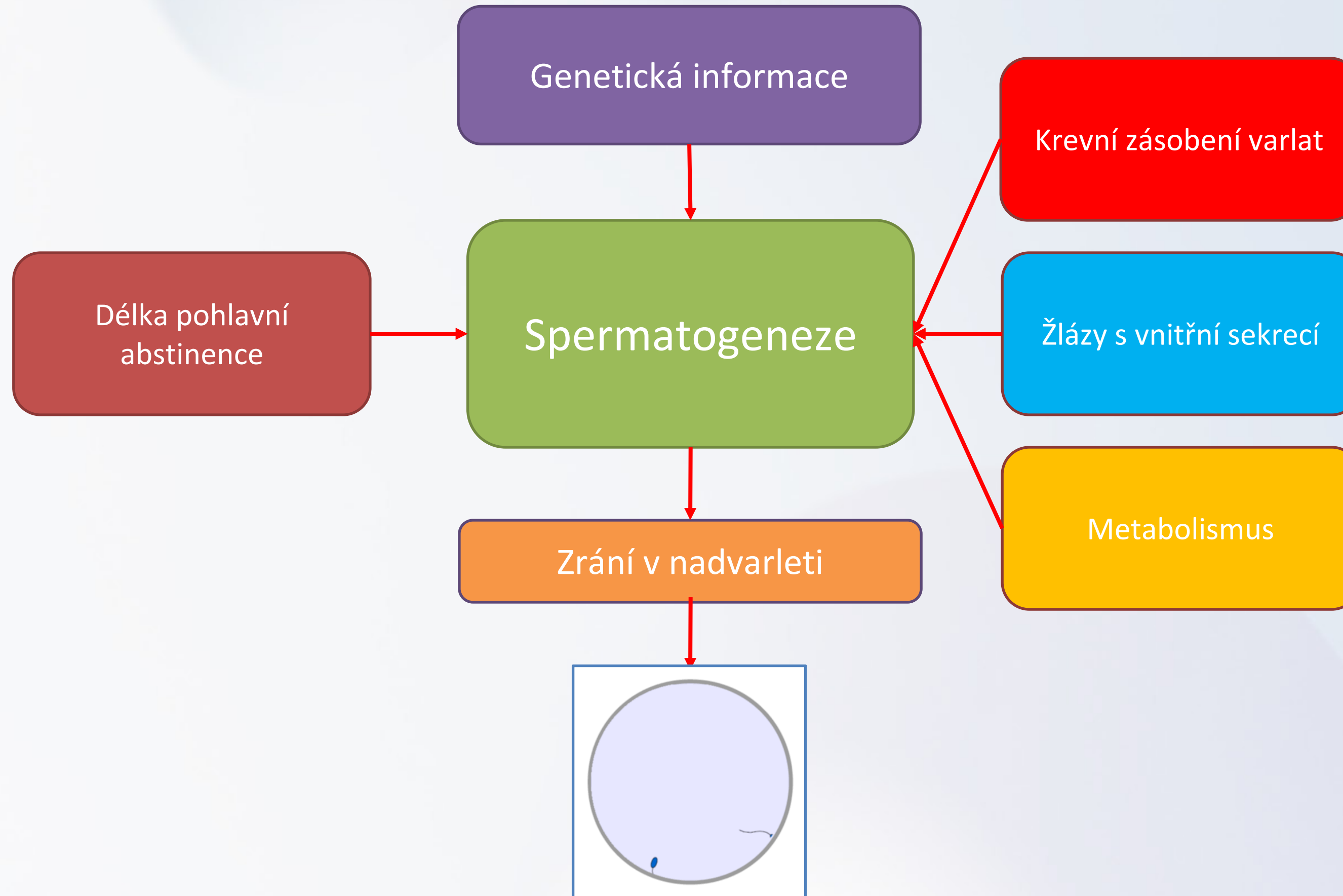
Spermie v ejakulátu představují velmi heterogenní populaci, liší se:

- pohyblivostí
- tvarem
- schopností oplodnit oocyt
- schopností zajistit normální vývoj embrya

Seminální plazma:

- je produktem přídatných pohlavních žláz (prostata, semenné váčky)
- její množství určuje objem ejakulátu a je ovlivněno řadou faktorů, značný vliv má hladina testosteronu a hydratace organismu
- spermie se v seminální plazmě nevyvíjejí a při fyziologickém oplození jsou spermie v seminální plazmě jen krátce

Plodnost a její hodnocení – kvalita a kvantita spermií

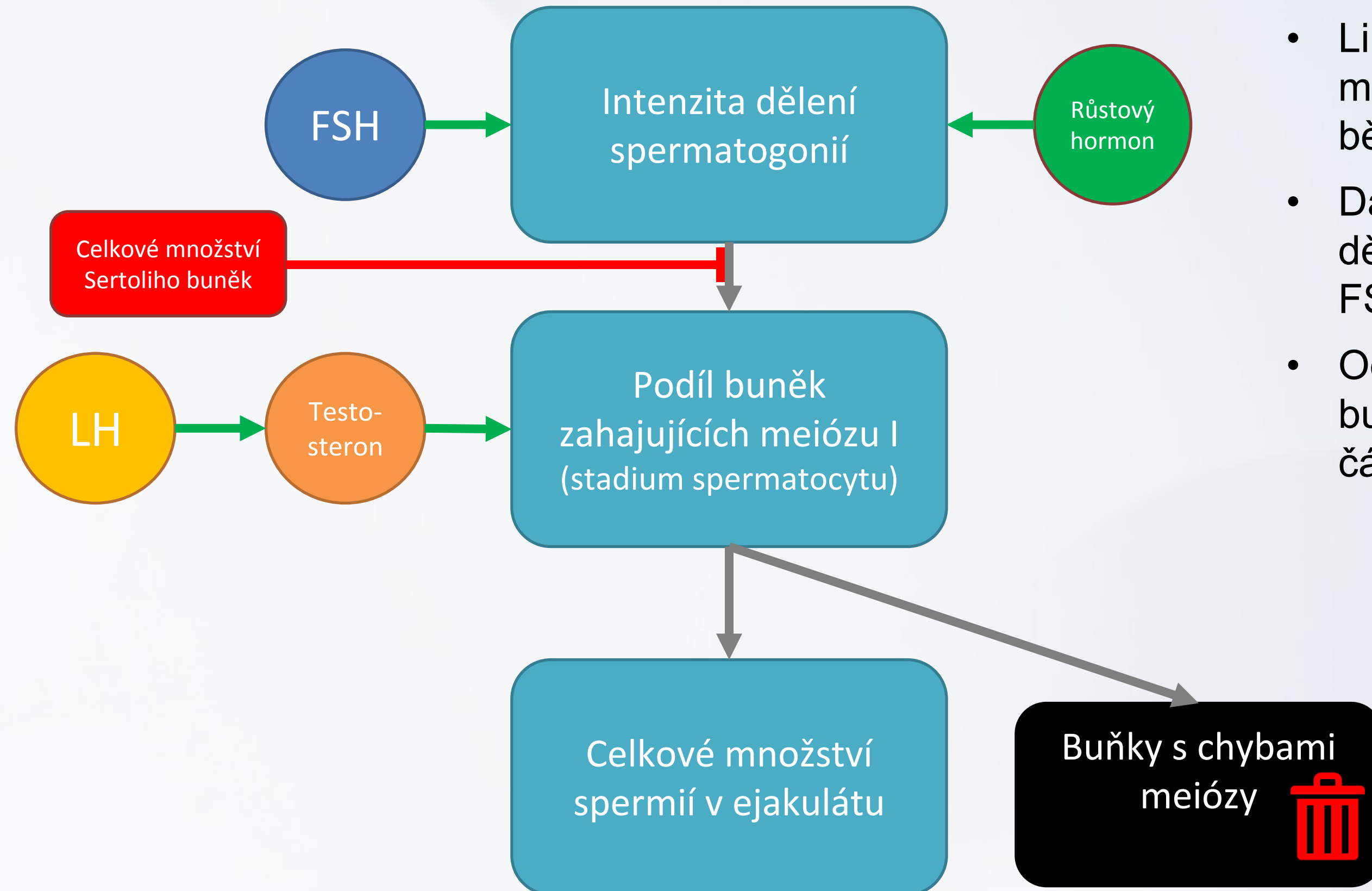


Plodnost a její hodnocení – spermatogeneze

Informaci o kvalitě spermatogeneze přináší:

- celkové množství spermií v ejakulátu
- podíl vitálních spermií
- podíl pohyblivých a progresivně pohyblivých spermií
- podíl morfologicky normálních spermií
- charakter morfologických abnormit spermií
- podíl spermií se zástavou maturace na úrovni testis (protaminy vs. histony)
- podíl spermií s dvouvláknovými zlomy DNA

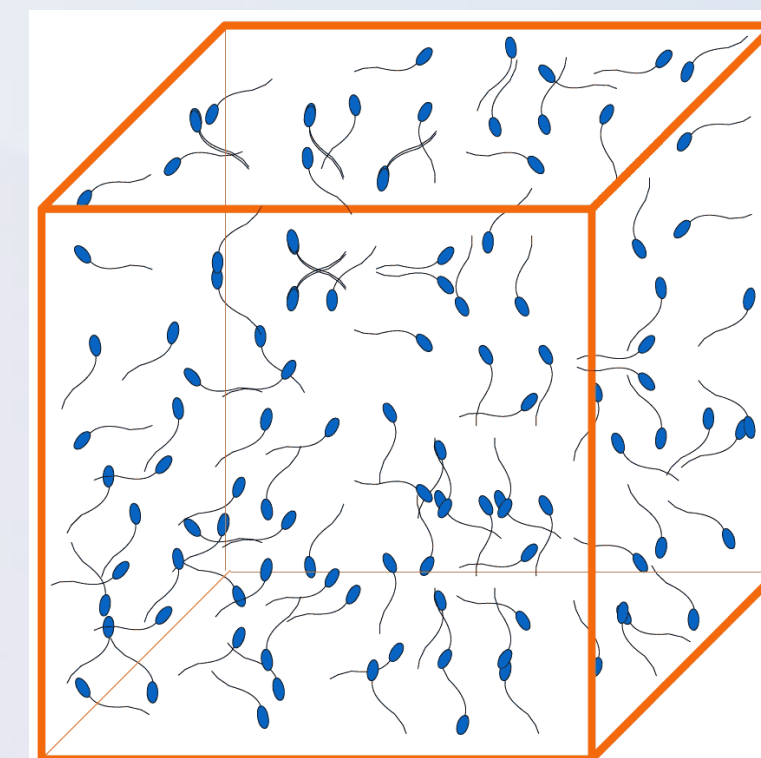
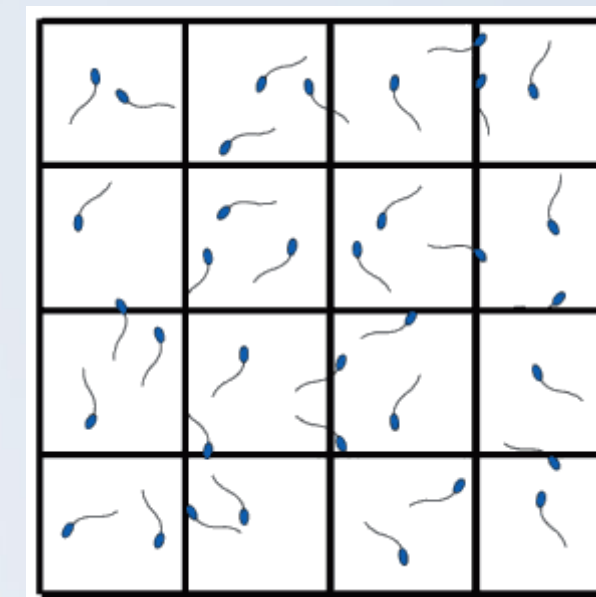
Plodnost a její hodnocení – produkce spermií



- Limitem intenzity spermatogeneze je množství Sertoliho buněk vzniklých během embryogeneze
- Dalším určujícím faktorem je intenzita dělení spermatogonií, kterou podporuje FSH a růstový faktor
- Od celkové produkce spermií se odčítají buňky s chybami v meióze, z nichž velká část zaniká a je odstraněna

Plodnost a její hodnocení – koncentrace spermií

- Koncentrace spermií je podílem celkového množství spermií v ejakulátu a jeho objemu.
- Její hodnota tedy závisí na objemu ejakulátu.
- **Důležitějším kritériem než koncentrace je celkové množství spermií**, které přímo ukazuje intenzitu spermatogeneze



Plodnost a její hodnocení – podíl vitálních spermií

- Délka života spermie je limitovaná a individuální.
- Po uplynutí životnosti spermie, cca 2 hodiny po kapacitaci nebo vlivem patologických činitelů spermie zaniká apoptózou.
- Apoptóza je spojena se vznikem dvouvláknových zlomů DNA, tedy s fragmentací DNA.
- I nepohyblivá spermie může být živá.
- Pouze živá (vitální spermie) může oplodnit oocyt, ať už *in vivo* nebo *in vitro*.

Plodnost a její hodnocení – pohyblivost spermií

Pohyblivost spermií je ovlivněna:

- jejich vitalitou, případně nastupující apoptózou
- stavem jejich pohybového aparátu (genetika, chyby při spermiogenezi)
- enzymatickou výbavou
- přítomností zdrojů energie
- jejich zralostí

Pouze rychle progresivně pohyblivé spermie jsou schopné oplodnit oocyt in vivo a po konvenčním oplození (bez mikromanipulace)

Plodnost a její hodnocení – pohyblivost spermií

Málo pohyblivé nebo nepohyblivé spermie - příčiny:

- Genetická vada (např. Kartagenerův syndrom, mutace postihující enzymy apod.)
- Probíhající nebo dokončená apoptóza
- Nezralé spermie (pohyb lze indukovat)

Plodnost a její hodnocení – morfologie spermií

Tvar spermie je určen:

- geneticky
- průběhem spermiogeneze (závěrečná fáze spermatogeneze)
- stupněm zralosti (zbytky cytoplazmy)

S normální morfologií je spojena schopnost oplození.

Mutace v určitých genech způsobují tzv. **monomorfní teratozoospermie**, to znamená uniformní postižení tvaru spermií (např. globozoospermie) s poruchou funkce

Plodnost a její hodnocení – zralost spermií

Cytoplazmatické a jaderné zrání spermií:

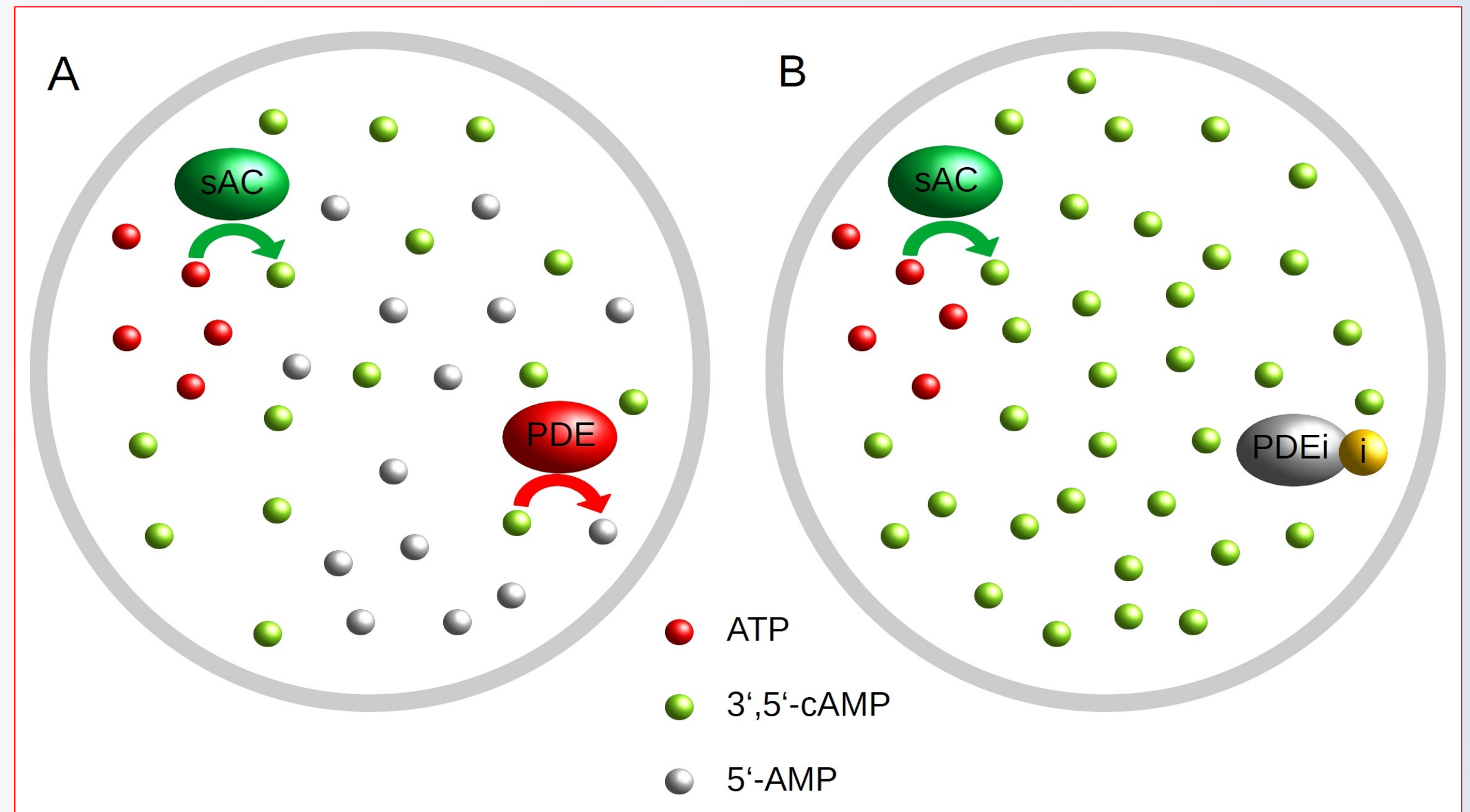
- Následuje po meióze, probíhá ve spojení spermatid se Sertoliho buňkami (spermiogeneze)
- Dokončuje se v nadvarleti
- Zráním získává spermie definitivní tvar, pohyblivost a schopnost oplodnit oocyt
- **Nezralé, ale oplození schopné spermie je možné odlišit od mrtvých spermií aktivací pohybu**

Plodnost a její hodnocení – aktivace pohybu spermií

- Když se spermie po umělé aktivaci začne pohybovat, je živá a pravděpodobně schopná oplodnit oocyt.
- K aktivaci pohybu spermie je nezbytná dostatečná koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu v cytoplasmě spermie.
- Cyklický adenosinmonofosfát je v cytoplasmě spermie syntetizován z ATP pomocí enzymu solubilní adenylátcyklázy.
- Odbouráván je pomocí fosfodiesterázy, tím je zajištěna stabilní hladina v cytoplasmě bičíku.
- Koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu lze zvýšit zábranou jeho odbourání.

Plodnost a její hodnocení – aktivace pohybu spermií

- Zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu se dosahuje **blokováním fosfodiesterázy**, která jej deaktivuje rozštěpením fosfodiesterové vazby.
- Fosfodiesteráza je blokována pomocí inhibitorů ze skupiny metylxantinů (např. teofylin).



Plodnost a její hodnocení – reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species):

- Jsou fyziologicky produkovány spermiemi, jsou nezbytné pro správnou funkci
- Nadměrné množství ROS spermie poškozuje (indukce apoptózy)
- Nadměrné množství vzniká:
 - ❖ Při apoptóze spermií – spermie, v nichž probíhá apoptóza produkují ROS
 - ❖ Při infekci – leukocyty pomocí ROS likvidují bakterie
- Mírou koncentrace ROS je redox potenciál, **výsledek je třeba analyzovat z hlediska příčiny**

Plodnost a její hodnocení – vyhodnocení muže

Ve všech parametrech používaných při hodnocení ejakulátu existuje **značná individuální variabilita**, fyziologické hodnoty se překrývají s patologickými.

Na základě běžného vyšetření spermogramu:

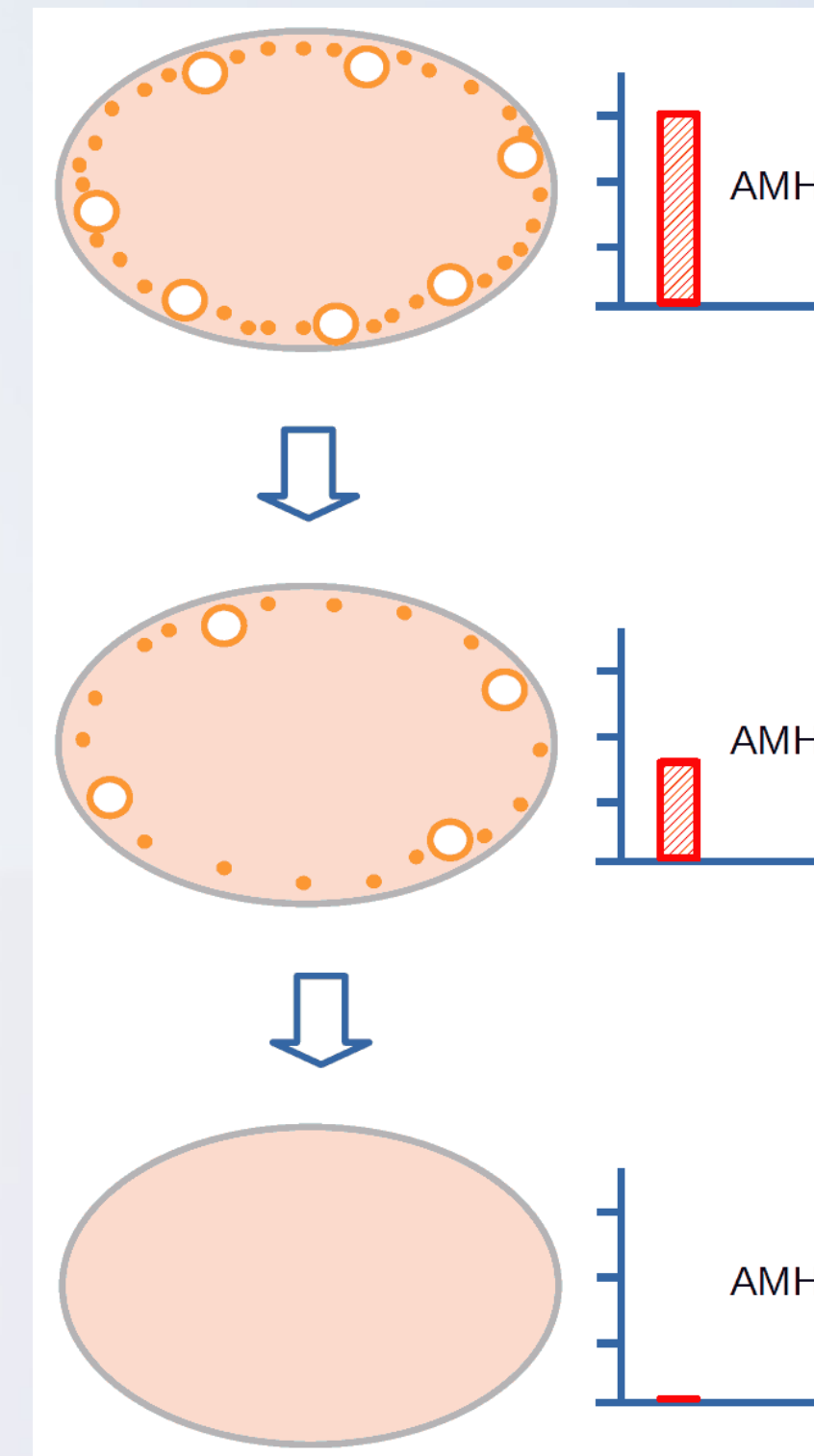
- není možné s určitostí **tvrdit, že muž je plodný** (existují např. genetické vady, bránící kapacitaci spermií nebo akrozomální reakci apod.)
- je možné potvrdit **pravděpodobnou neplodnost muže** při opakovaném úplném chybění spermií v ejakulátu nebo nedostatečné pohyblivosti.
- k definitivnímu závěru je třeba doplnit klinické vyšetření a další testy
- smyslem běžného vyšetření je stanovit **pravděpodobnost**, že muž je plodný, případně navrhnout terapeutický postup

Plodnost a její hodnocení – ovariální rezerva

- Ovariální rezerva – množství primordiálních folikulů, schopných zahájit růst a zrání
- Primordiální folikuly postupně zahajují růst (nábor) a mění se na antrální folikuly
- Malé antrální folikuly produkují antimülleriánský hormon (AMH), který zpětnou vazbou tlumí aktivaci dalších primordiálních folikulů
- Malé antrální folikuly lze spočítat při sonografickém vyšetření a jejich množství odhadnout podle produkce AMH
- Množství malých antrálních folikulů přibližně reprezentuje celkové množství folikulů.

Plodnost a její hodnocení – ovariální rezerva a věk

- Indikátorem ovariální rezervy je množství malých antrálních folikulů
(předpoklad: čím více primordiálních folikulů, tím více jich zahájí růst a přemění se v antrální folikuly)
- Malé antrální folikuly lze spočítat při sonografickém vyšetření a jejich množství odhadnout podle produkce AMH



Plodnost a její hodnocení – kvalita oocytů

- Kvalita oocytů závisí na:
 - ❖ Zdravotním stavu ženy (PCOS, endometrióza)
 - ❖ Věku (aneuploidie)
 - ❖ Průběhu zrání oocytu
 - ❖ Máme málo prostředků pro určení kvality oocytů

Plodnost a její hodnocení – ovulace

- **Anovulační cykly** se vyskytují i u pravidelně menstrujících žen, zejména u velmi mladých
- Častou příčinou anovulace jsou syndrom polycystických ovaríí, hypothyreóza, obezita, kouření a další
- Detekce ovulace je možná sonograficky nebo vyšetřením hladiny progesteronu

Plodnost a její hodnocení – transport oocytu a embrya

Transport oocytu a embrya vejcovodem závisí na:

- Průchodnosti vejcovodu
- Motilitě vejcovodu
 - ❖ Estradiol motilitu zvyšuje
 - ❖ Progesteron motilitu snižuje
 - ❖ Motilita závisí na množství a kvalitě receptorů pro estradiol
 - ❖ Motilitu negativně ovlivňuje kouření

Plodnost a její hodnocení – prostředí vejcovodu a děložní prostředí

Prostředí vejcovodu a děložní prostředí má rozhodující vliv na vývoj embrya

- Živiny – pyruvát, glukóza, aminokyseliny
- Růstové faktory
- Optimální pH – hydrogenkarbonátový pufr (hydrogenkarbonát a oxid uhličitý)
- Optimální koncentrace kyslíku (3 – 5 %)
- Prostředí výrazně zhoršují probíhající záněty (enzymy, cytokiny, bakteriální toxiny)

Plodnost a její hodnocení – receptivita endometria

- Receptivita endometria je schopnost umožnit implantaci a další vývoj blastocysty
- Receptivita endometria se v průběhu cyklu mění – **implantační okno**
- Implantační okno je časový úsek, kdy může dojít k implantaci
- Část žen má implantační okno **posunuté** oproti předpokládanému (průměrnému) stavu
- Polohu implantačního okna můžeme zjistit na základě analýzy genové exprese (proteiny, RNA)

Umělé oplodnění - úvod

Vyšetření páru



Stanovení diagnózy



Stanovení léčebného postupu



Léčba metodami asistované reprodukce

muž

Genetické vyšetření
Kvalita spermií
Schopnost koitu
Schopnost ejakulace

žena

Gynekologické vyšetření
Genetické vyšetření
Vyšetření ovulace
Vyšetření ovariální rezervy
Vyšetření implantačního okna

„Stimulace“ vaječnicků
Indukce ovulace
Odběr oocytů
Oplození in vitro
Kultivace in vitro
Výběr embrya
Kryokonzervace blastocyst
Příprava k transferu embrya
Transfer embrya

Umělé oplodnění – zpracování spermií

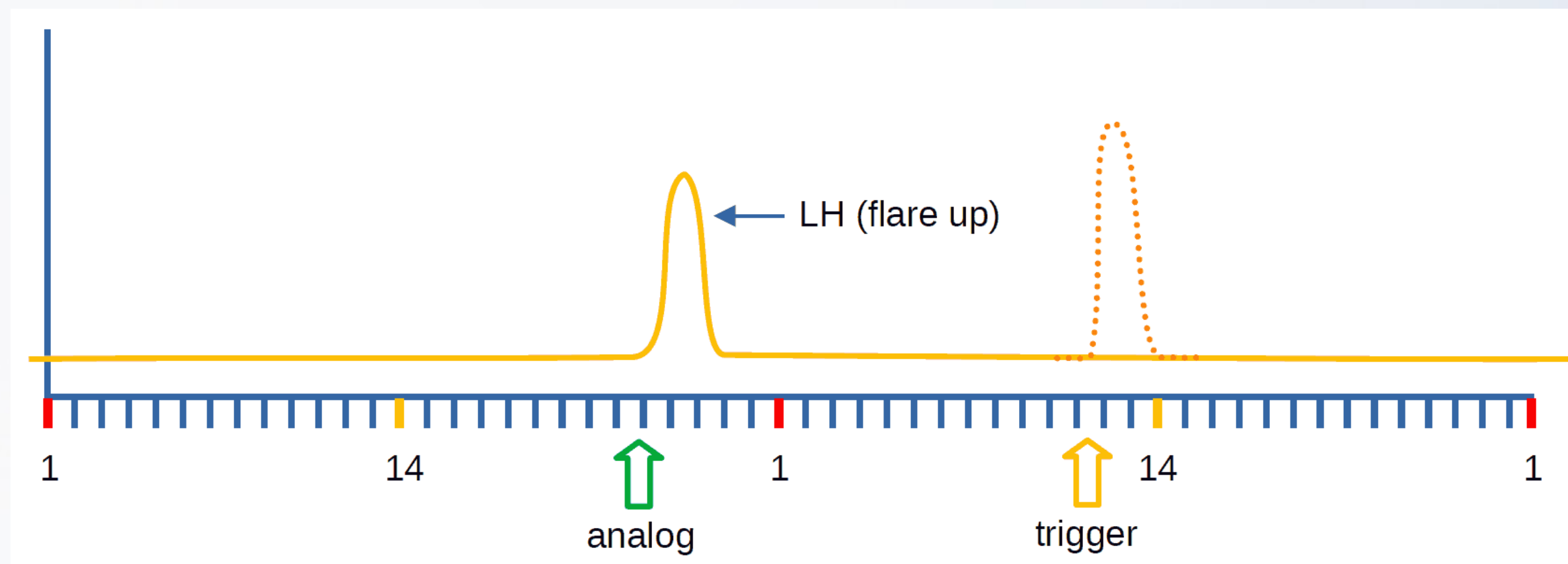
- Spermie představují značně heterogenní populaci, jen část má schopnost oplodnit vajíčko
- Kvalitu spermií značně ovlivňuje nástup apoptózy
- Počínající apoptóza je spojená se snížením pohyblivosti spermií
- Schopnost progresivního pohybu spermií je spojena se schopností oplodnit vajíčko (i při použití mikromanipulačních metod)
- Cílem zpracování spermií je selekce spermií schopných oplodnit oocyt a umožnit jeho další vývoj
- Každá metoda selekce spermií by měla zahrnovat **výběr podle pohyblivosti**

Umělé oplodnění – blokování vlastního cyklu

- Cílem přípravy na odběr oocytů je **co největší kontrola nad cyklem**, zábrana přirozeného **vzestupu luteinizačního hormonu v nevhodnou dobu**
- Předčasný vzestup LH by narušil zrání folikulu a mohl by vyvolat předčasnou ovulaci.
- K blokování vzestupu LH se používá dvou různých metod, které se liší u tzv. **dlouhého protokolu** a tzv. **krátkého protokolu**

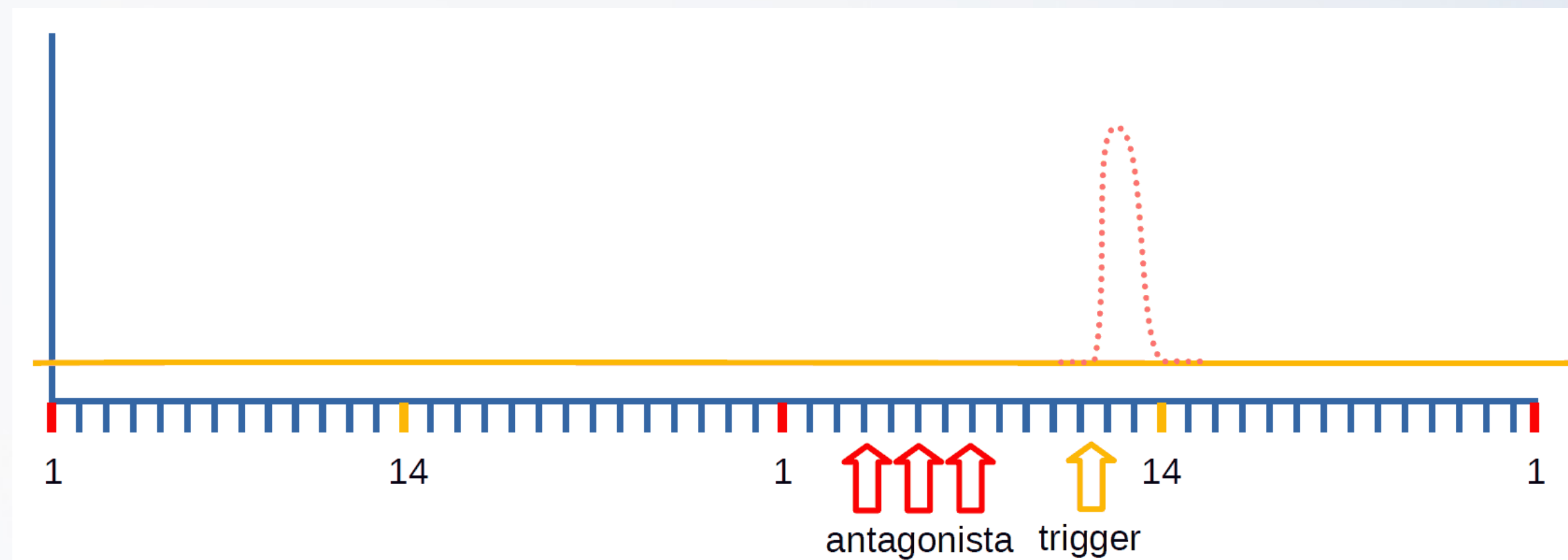
Umělé oplodnění – dlouhý protokol

- K blokování sekrece gonadotropinů se používá podání **depotního agonisty GnRH** v cyklu předcházejícím léčebný
- Ten způsobí krátkodobý vzestup koncentrace FSH a LH (flare up fenomén) s následnou dlouhodobou bloádou gonadotropních buněk hypofýzy
- Blokáda je způsobena zahlcením GnRH receptorů kontinuální hladinou analoga



Umělé oplodnění – krátký protokol

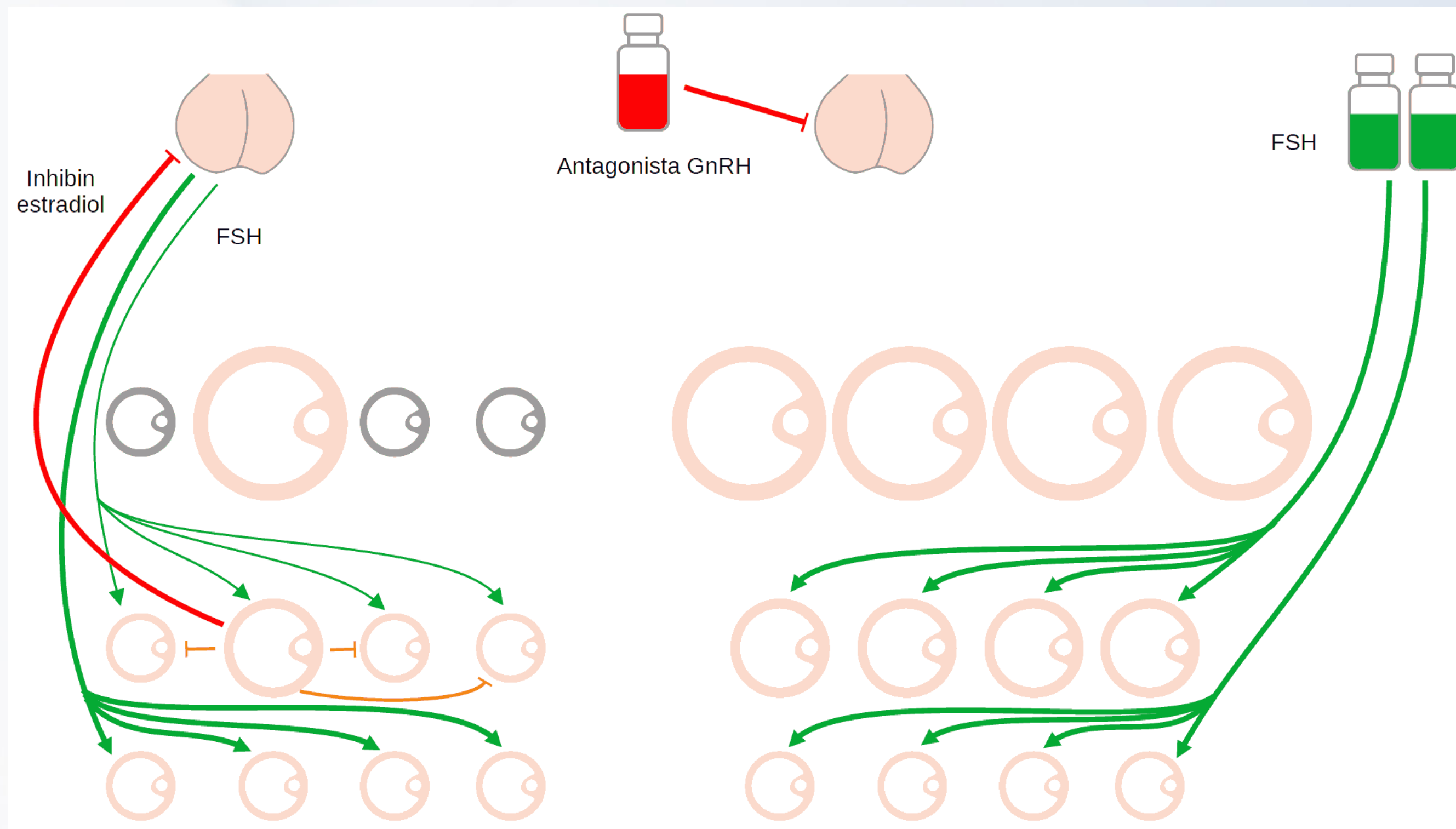
- Při použití tzv. krátkého protokolu se v období od začátku podávání FSH několikrát aplikuje **antagonista GnRH**, který zablokuje receptory pro GnRH na gonadotropních buňkách hypofýzy
- Nenastane tak spontánní pík LH



Umělé oplodnění – ovariální „stimulace“

- Takzvaná ovariální stimulace je založena na **zábraně selekce dominantního folikulu**
- Za fyziologických podmínek dominantní folikul, který ostatní předběhl v růstu, způsobí zánik ostatních folikulů z kohorty
- Externí podání folikuly stimulujícího hormonu „zrovnoprávní“ všechny folikuly, takže se **neuplatní princip dominance**, menší folikuly **nezaniknou atrezií**, ale vyrostou a oocyty v nich dozrají
- Nejde tedy o rekrutaci nových folikulů nebo nějakou stimulaci jejich vzniku
- Podle koncentrace AMH a počtu malých antrálních folikulů můžeme odhadnout **odpověď ovarií na podání FSH** (rostoucí folikuly vznikají z malých antrálních folikulů)

Umělé oplodnění – ovariální „stimulace“



Umělé oplodnění – indukce procesů zrání

Indukce procesů zrání (trigger), také se nazývá **indukce ovulace**, k ovulaci ale u většiny metod asistované reprodukce nedojde, oocyty se odeberou ovariální punkcí.

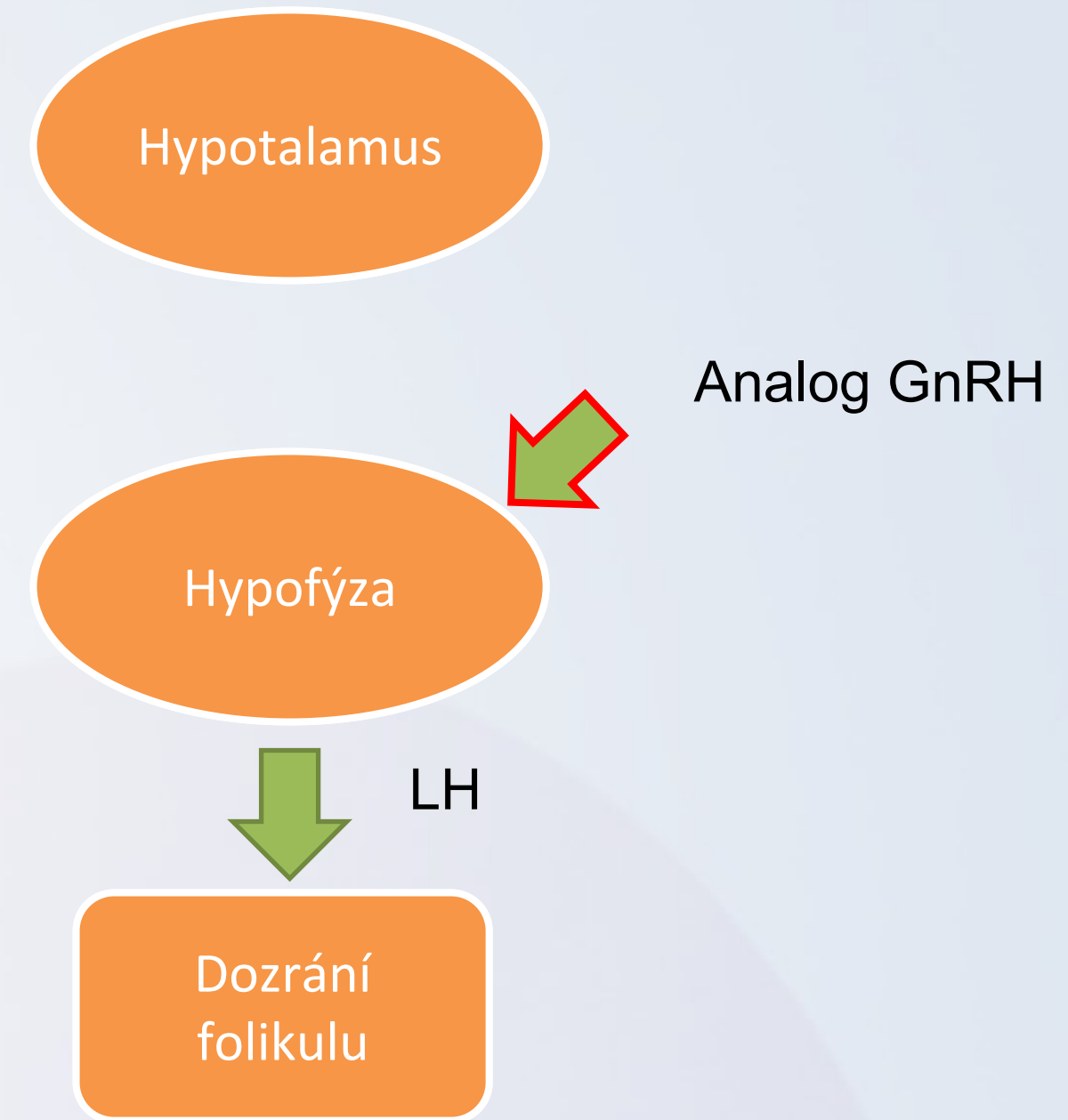
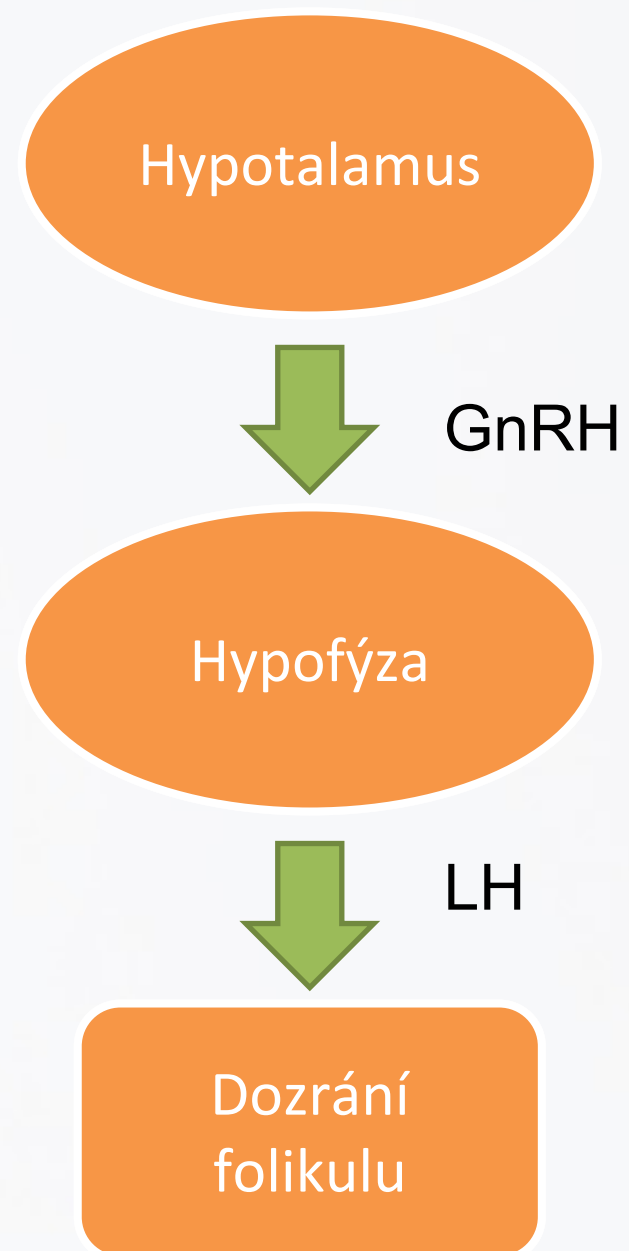
- Cílem je dosáhnout **resumpce meiózy a dozrání cytoplazmy oocytu**
- Za fyziologických okolností je spouštěčem (triggerem) pík luteinizačního hormonu.
- Luteinizační hormon, i když by to bylo ideální, se nepoužívá pro extrémně vysokou cenu

Umělé oplodnění – indukce procesů zrání

Dva způsoby umělé indukce zrání:

- Nejčastěji pomocí injekce **lidského choriového gonadotropinu (hCG)**, který má některé vlastnosti luteinizačního hormonu – je však vyšší riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu
- Zejména při vyšším riziku ovariálního hyperstimulačního syndromu vyvoláním sekrece luteinizačního hormonu tzv. **flare up efektem podání analogu GnRH**

Umělé oplodnění – indukce procesů zrání (trigger)



Umělé oplodnění – konvenční oplození in vitro

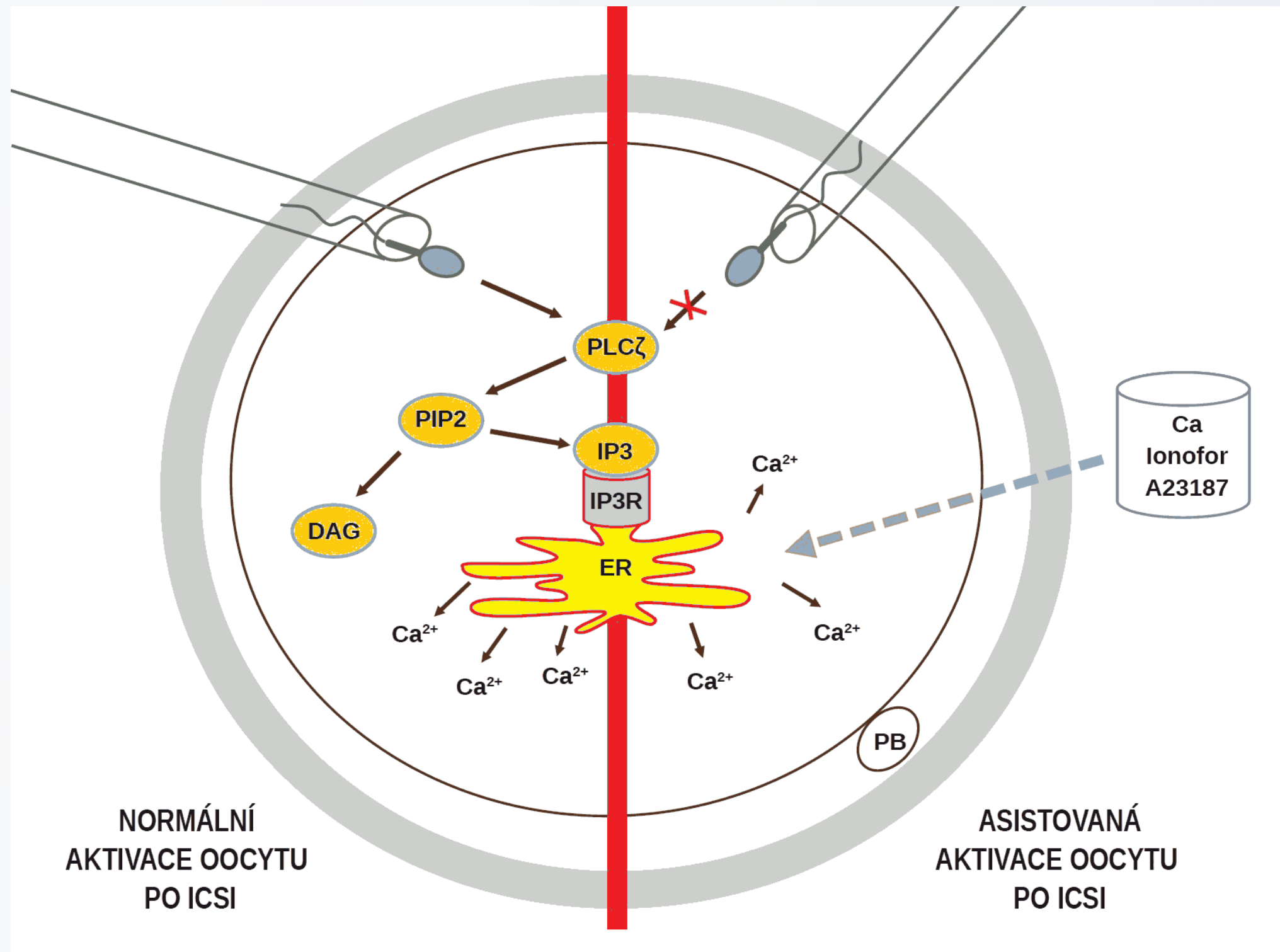
Spermie oplodní oocyt uzavřený v kumulu spontánně

- Předpokladem je přítomnost **progresivně rychle pohyblivých spermií** (pomalá spermie nevyvine dostatečnou sílu k prostupu zonou)
- Důležitá je správná koncentrace spermií – při nízké koncentraci nemusí být v blízkosti oocytu přítomna žádná spermie schopná oplodnit, při vysoké dojde k polyspermii
- Fertilizační medium – obsahuje glukózu, kterou oocyt ani časné embryo neutilizuje, je důležitá pro funkci spermií

Umělé oplodnění – oplození pomocí ICSI

- Umožňuje použít i nepohyblivé ale živé spermie nebo elongované spermatidy
- Předpokladem pro úspěšné oplození je **přítomnost látek aktivujících oocyt (zejména fosfolipáza C ζ) ve spermii.**
- Aby tyto látky mohly oocyt aktivovat, je nezbytné **narušit membránu spermie** (zhmoždění bičíku), aby se uvolnily do cytoplazmy oocytu
- Při neschopnosti spermií aktivovat oocyt je nezbytná **umělá aktivace oocytu**, nejčastěji pomocí ionoforu
- Při nepohyblivých spermiích nebo elongovaných spermatidách je nutné detegovat živé – umělá aktivace pohybu spermie, případně hypoosmotický test nebo laser

Umělé oplodnění –aktivace oocyty



PIP₂ - fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát

DAG - diacylglycerol

IP₃ - inositoltrisfosfát

IP₃R - inositoltrisfosfát receptor

ER - endoplazmatické retikulum

PB - pólocyt

Umělé oplodnění – kultivace embryí

Fyziologické podmínky:

- Osmotická koncentrace
- pH
- Ionty
- Zdroje energie
- Komponenty pro stavbu buněčných struktur
- Přiměřená koncentrace kyslíku
- Růstové faktory

Umělé oplodnění – kultivace embryí

- Osmotická koncentrace
 - ❖ Optimum 280 mmol/l po oplození, 290 mmol/l na stadiu blastocysty
 - ❖ Schopnost udržovat osmotickou rovnováhu se vyvíjí postupně během rýhování s vývojem membránových transportérů
 - ❖ Osmotickou koncentraci media udržují ionty, glukóza, aminokyseliny

Umělé oplodnění – kultivace embryí - media

- pH 7,2 až 7,4
- Kationty sodíkové, draslíkové, kalciové a magnesiové
- Anionty **hydrogenkarbonátové**, chloridové, **fosfátové**, sulfátové
- Zdroje energie
 - ❖ Na stadiu oocyty a embrya do 8b stadia **pyruvát** (laktát)
 - ❖ Od 8b stadia **glukóza**
 - ❖ Na stadiu blastocysty se konzumpce glukózy dále zvyšuje (aktivace dalších glukózových transportérů)

Umělé oplodnění – kultivace embryí – media

- Makromolekulární sloučeniny – albumin a hyaluronan
 - ❖ Chrání cytoplazmatickou membránu
 - ❖ V cytoplazmě embryonálních buněk je albumin degradován na aminokyseliny a hyaluronan na monosacharidy
- Komponenty pro stavbu buněčných struktur
 - ❖ Aminokyseliny – stavba proteinů a bází nukleových kyselin
 - ❖ Fosfátový iont – syntéza nukleosidů, fosforylace proteinů
 - ❖ Hydrogenkarbonátový iont – syntéza thyminu, cytosinu a uracilu
 - ❖ Vitaminy – syntéza koenzymů a dalších látek

Umělé oplodnění – kultivace embryí

- Přiměřená koncentrace kyslíku
 - ❖ **Optimální koncentrace** kyslíku v kultivačním prostředí je 2 až 7% (odpovídá koncentraci kyslíku ve vejcovodu a děloze)
 - ❖ Běžně užívaná 5 až 6 %
 - ❖ Při vyšší koncentraci kyslíku probíhají netypicky **metabolické cesty** a zvyšuje se koncentrace **reaktivních forem kyslíku**

Umělé oplodnění – kultivace embryí

Růstové faktory

- In vivo embryo vzájemně komunikuje s vejcovodem a dělohou prostřednictvím látek jedna **rozpuštěných**, jednak přítomných v **extracelulárních vezikulách**
- Během kultivace existuje snaha doplnit kultivační medium o látky za fyziologických okolností produkované epitelem vejcovodu a endometria např. GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

Umělé oplodnění – kultivace embryí

Kultivační media sekvenční a jednokroková

- Sekvenční media **respektují odlišné potřeby** embrya od oplození po 8b stadium a od 8b stadia výše
- Jednokroková media
 - ❖ Kompromis ve složení
 - ❖ **Minimalizace manipulací**

Umělé oplodnění – transfer embryí

- Fyziologický postup předpokládá transfer jednoho embrya
- Transferovat je třeba v tzv. implantačním okně

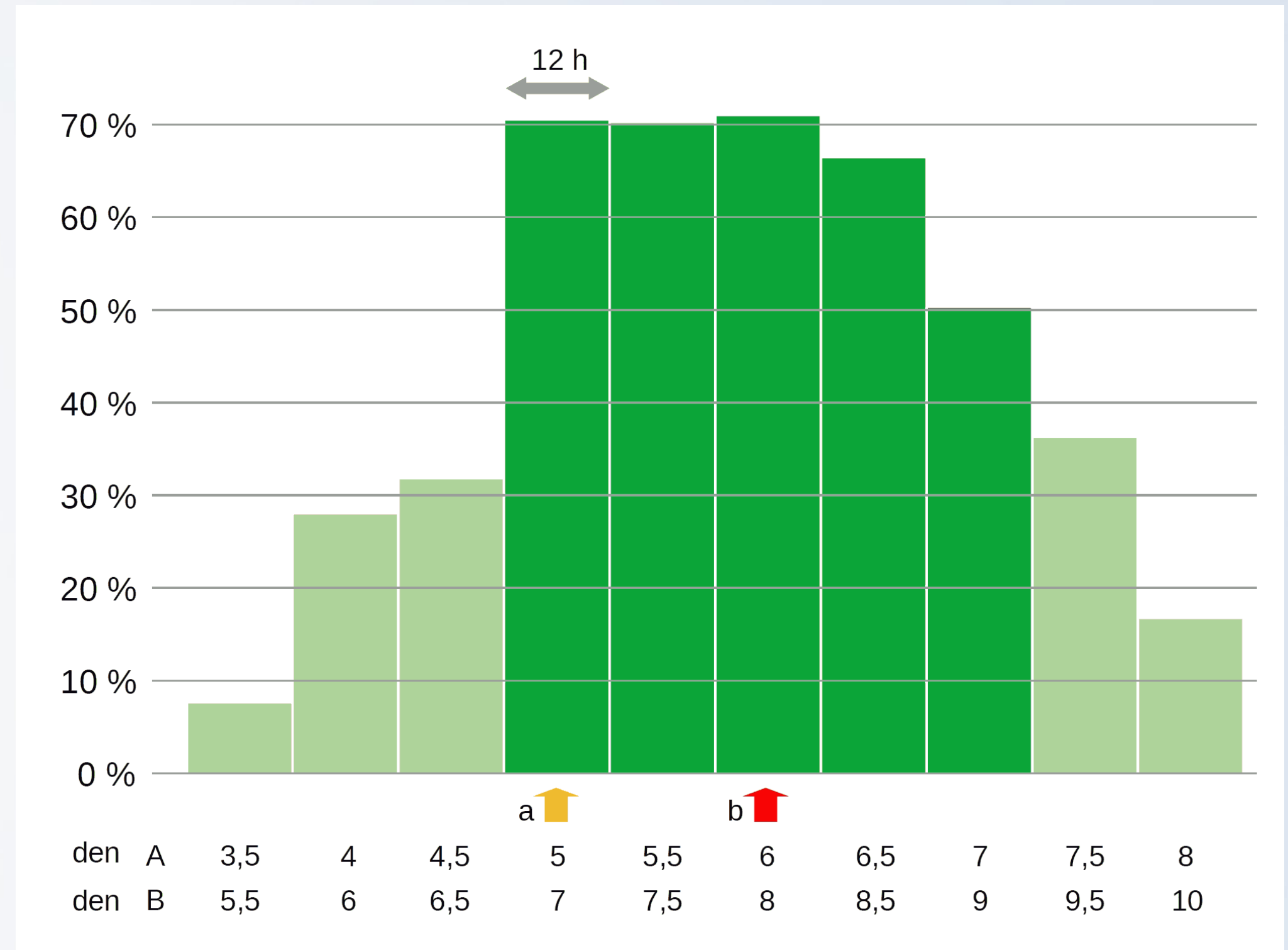
Typická poloha implantačního okna

A – dny od vzestupu koncentrace progesteronu

B – dny od píku luteinizačního hormonu

a – čas, kdy blastocysta započne hatching

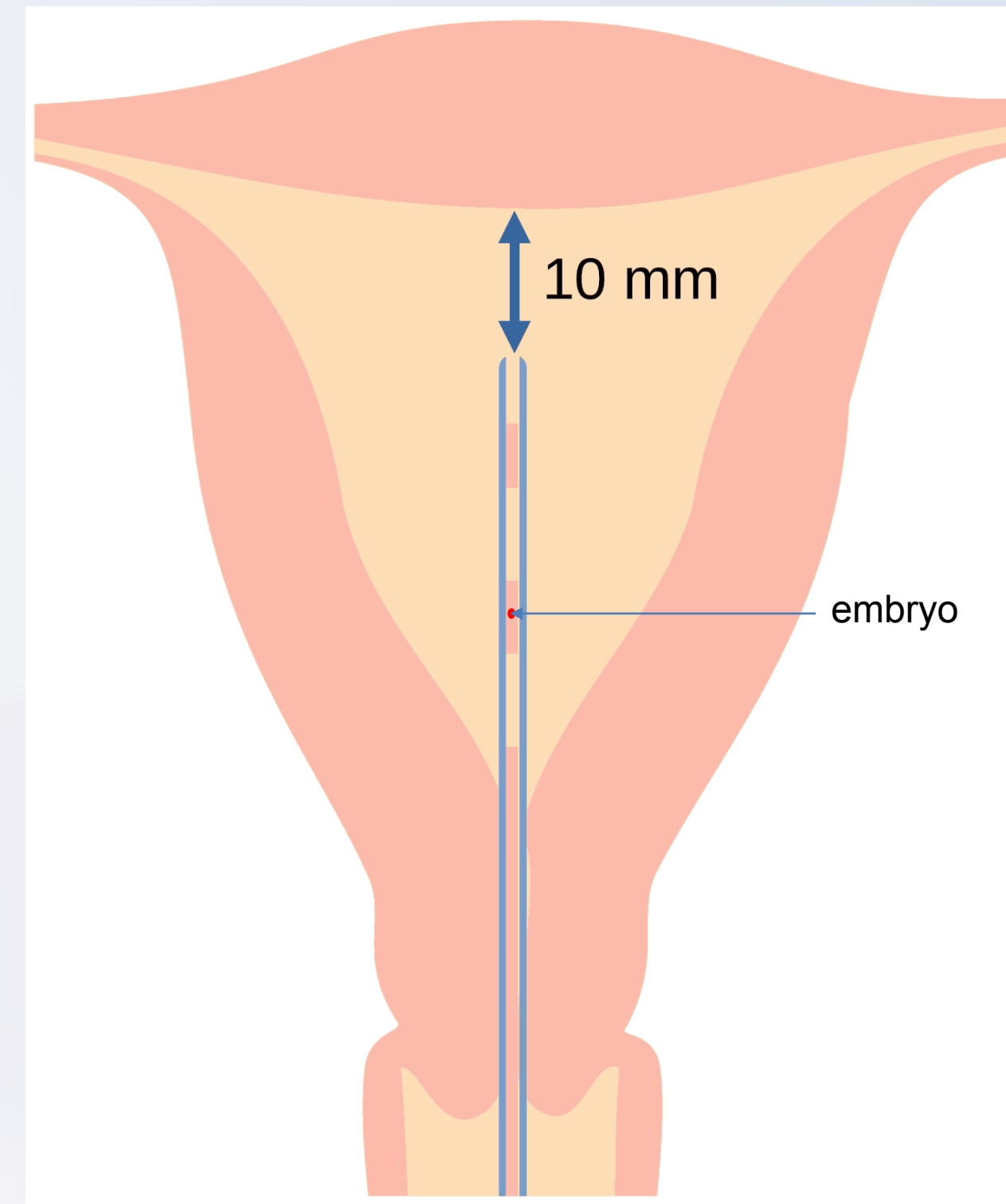
b – čas zahájení implantace



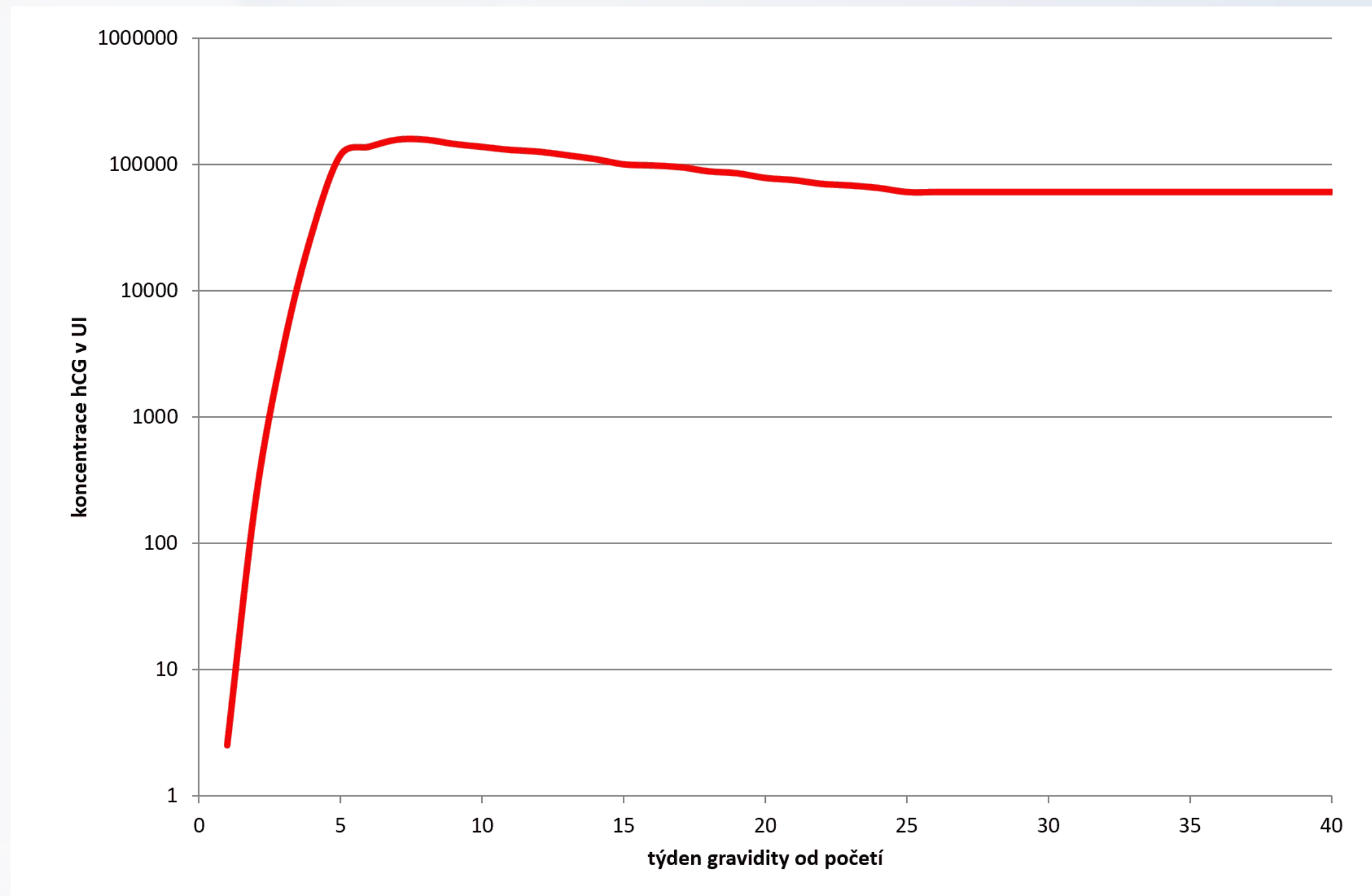
Umělé oplodnění – transfer embryí

Transferovat je třeba

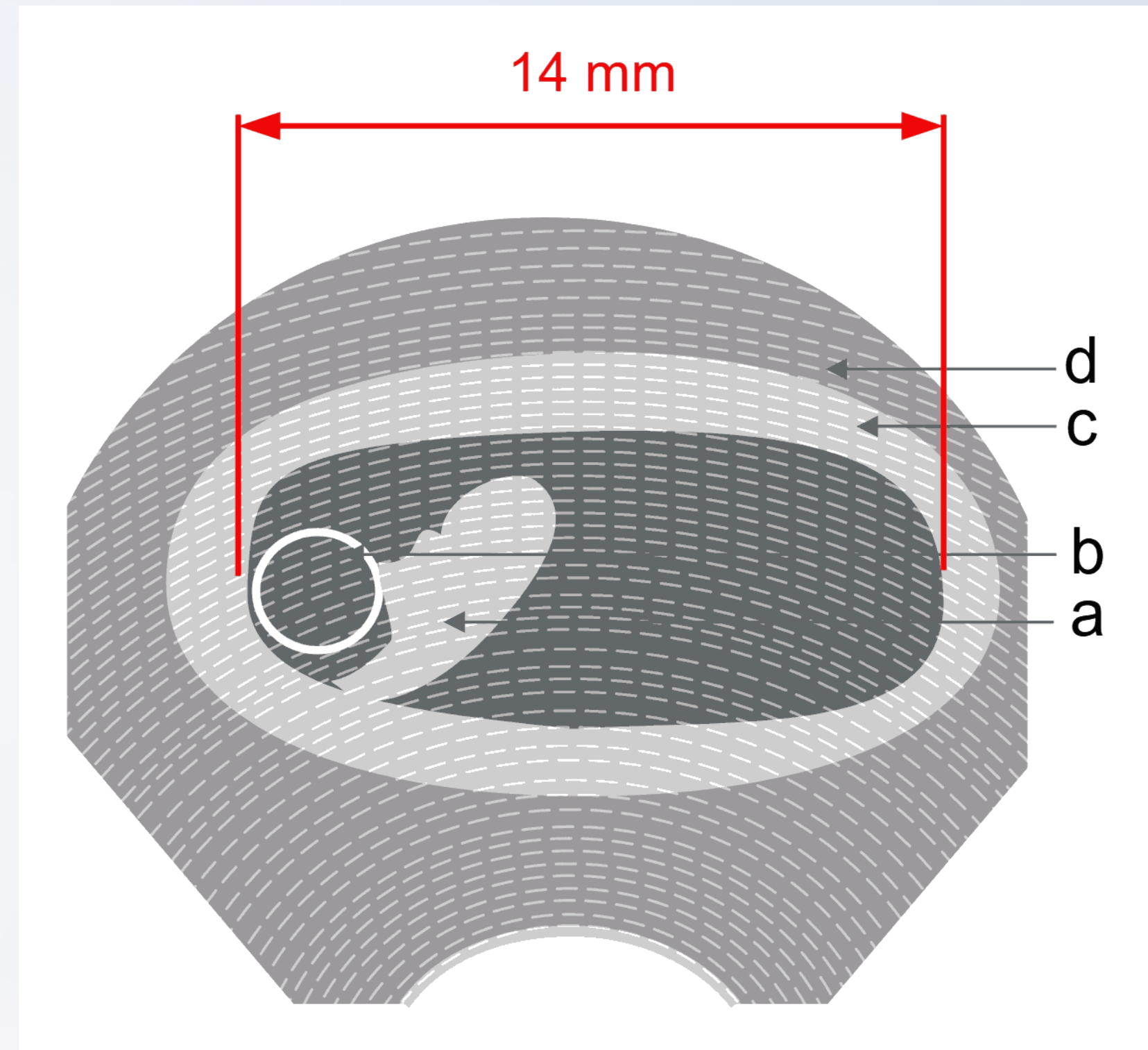
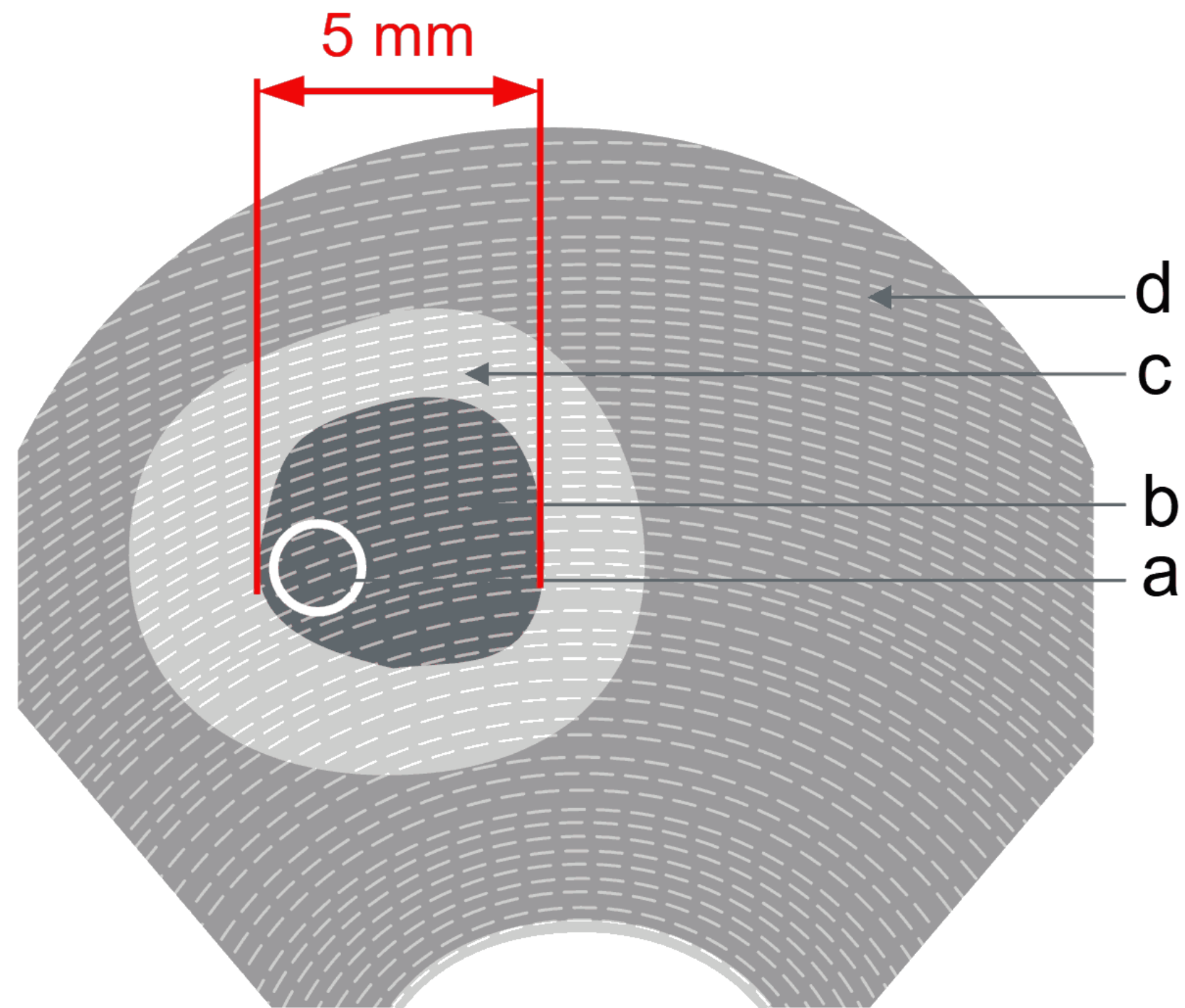
- na správné místo
- správným způsobem



Umělé oplodnění – detekce gravidity β hCG



Umělé oplodnění – detekce gravidity sonograficky



Kontakt



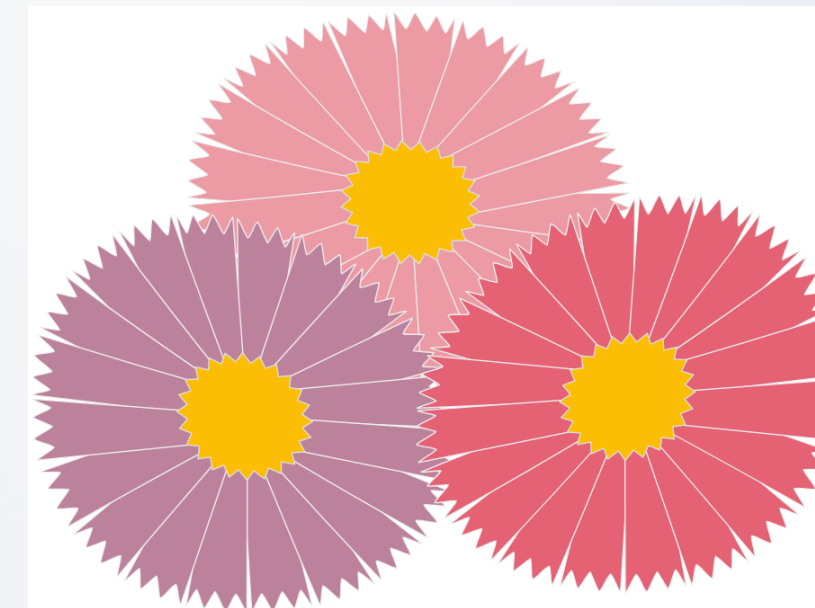
Prof. MUDr. Pavel Trávník, DrSc.

Samostatný vědecký pracovník

+420 724 043 593

ptravnik@repromeda.cz

www.repromeda.cz



Děkuji vám za pozornost