

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 2.5.2012

# Lékařsky asistovaná reprodukce

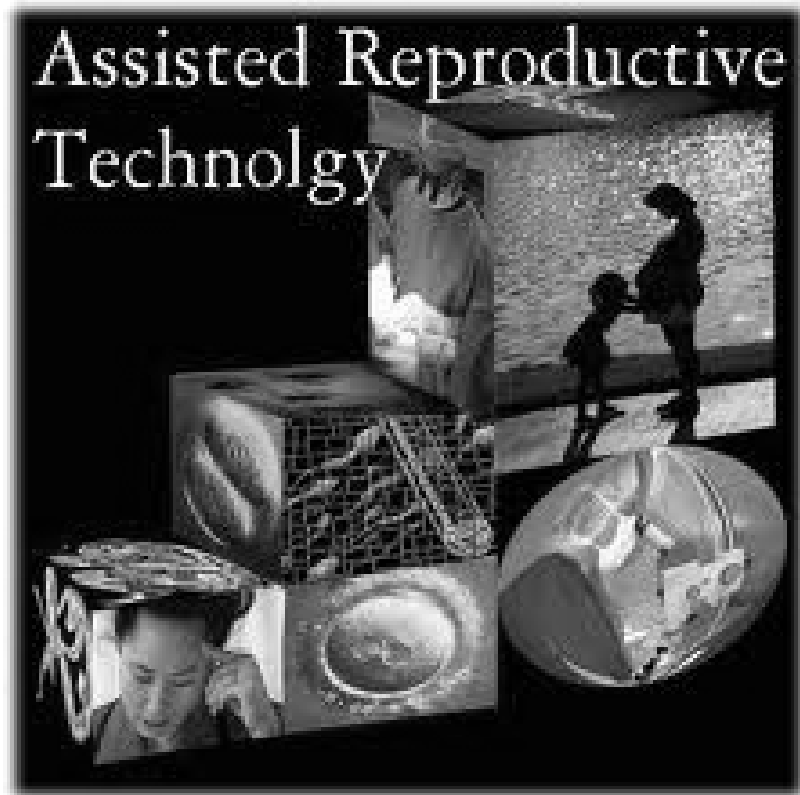
doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Assisted Reproductive Technolgy



---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## Program přednášky:

- neplodnost a její příčiny
- lékařsky asistovaná reprodukce  
historický vývoj  
základní rozdělení a přehled metod  
IVF a její modifikace
- in vitro fertilizace  
historický vývoj  
standardní průběh IVF  
modifikace IVF
- klonování člověka  
klonování pro výzkumné účely / terapeutické klonování  
reprodukční klonování



# NEPLODNOST A JEJÍ PŘÍČINY

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## NEPLODNOST:

- snížená nebo chybějící schopnost zplodit potomka (NE kompletní neschopnost mít děti, NE sterilita)
- po uplynutí 1 roku při nechráněném pravidelném styku nedošlo k otěhotnění
- celosvětové statistiky WHO:

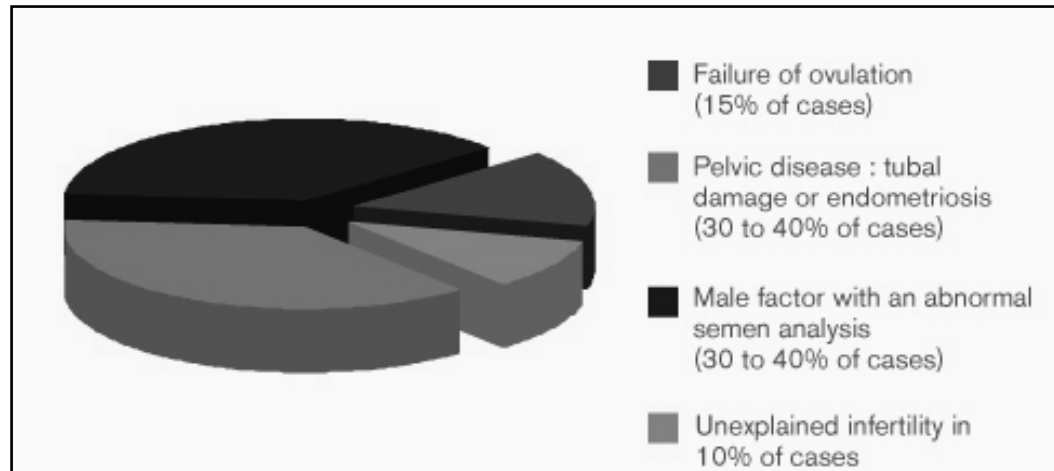
5 - 15 % párů:

neschopnost počít dítě

10 - 25 % párů:

neschopnost počít druhé nebo další dítě  
(tzv. sekundární infertilita)

## Příčiny neplodnosti:



- 1/3 of couples : problem is exclusively identified in males.
- 1/3 of couples: problem of infertility identified only in females.
- 1/3 of couples: anomalies detected in both partners.



## Kategorie neplodnosti dle WHO

### Primární neplodnost

= naprostá absence početí i přes pravidelný nechráněný pohlavní styk po dobu jednoho roku

### Sekundární neplodnost

= i přes pravidelný nechráněný pohlavní styk po dobu jednoho roku nedošlo k žádnému novému početí poté, co v minulosti k oplodnění došlo

### Pravidelné spontánní potraty / kojenecká úmrtnost

= úmrtnost živě narozených dětí před dosažením pátého roku života

### "Neobjasněná neplodnost"

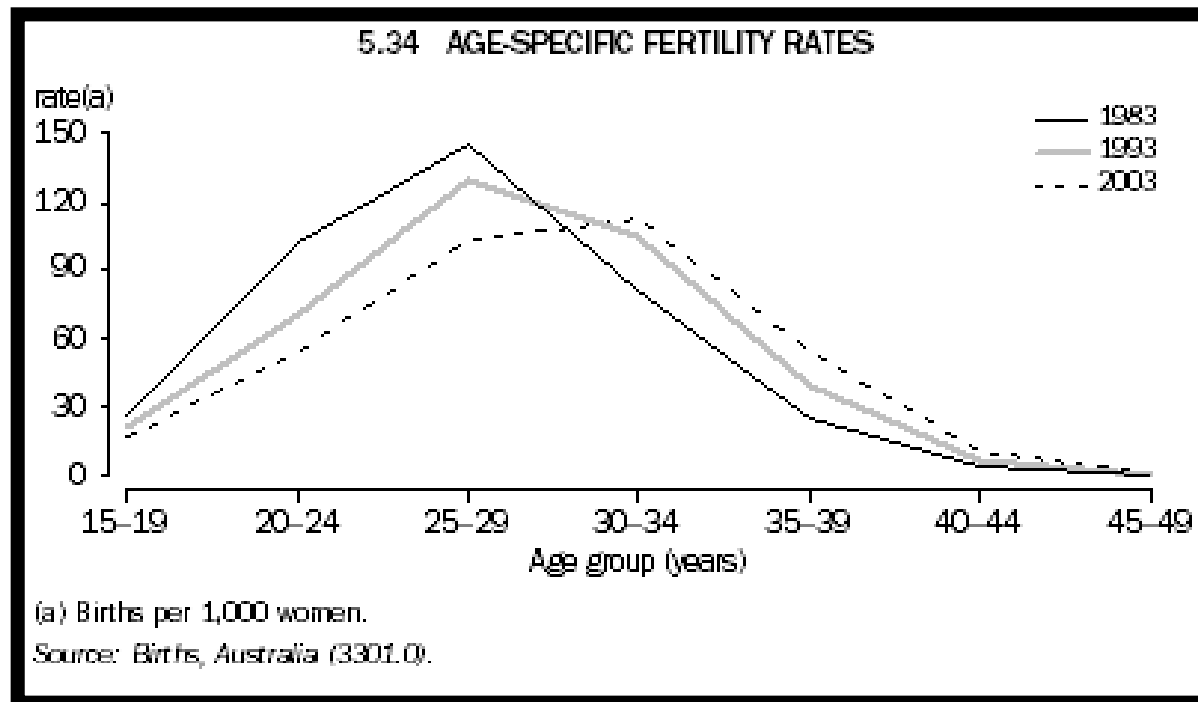
= absence početí způsobená faktory jako laktace, antikoncepce, snížená sexuální aktivita nebo z neznámých příčin

## Příčiny neplodnosti:

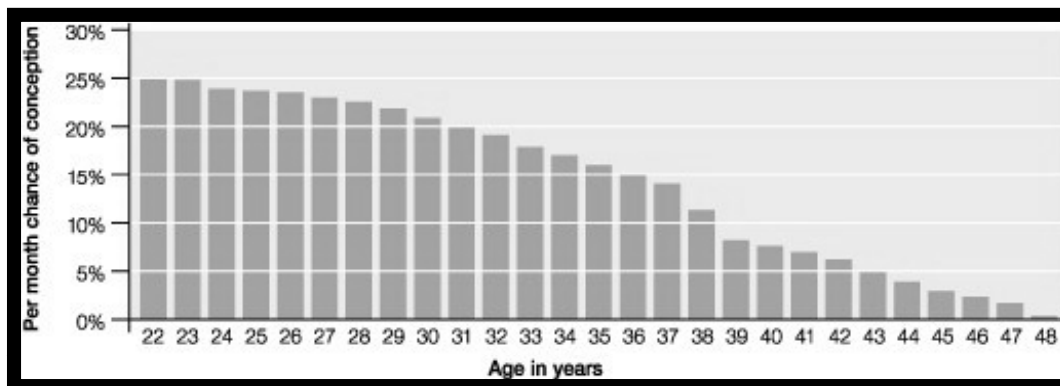
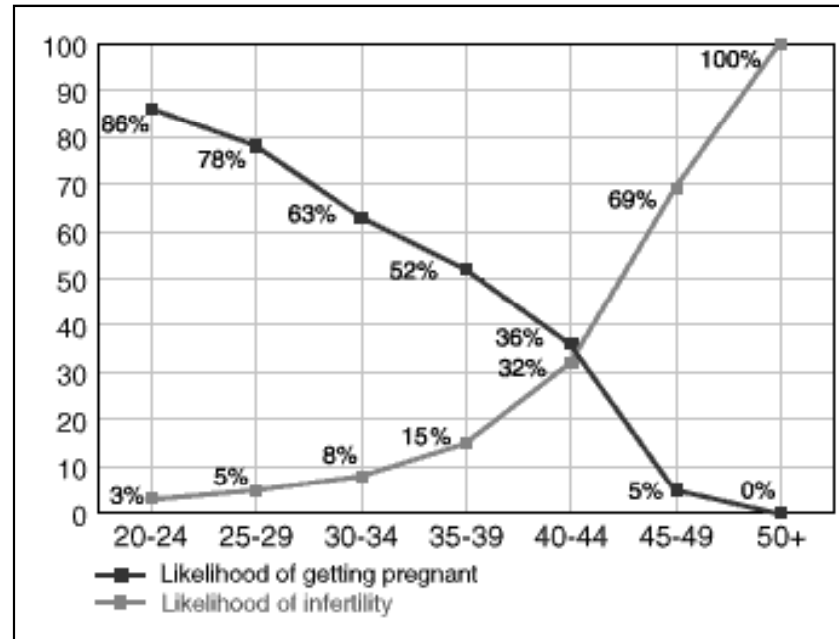
- ženská neplodnost  
poškození vejcovodů, hormonální poruchy (→ produkce oocytů), vrozené vývojové vady dělohy, endometrióza, genetické či imunologické faktory neplodnosti (rejekce spermatu), problémy s nidací
- mužská neplodnost  
nízká kvalita spermatu, autoimunitní problémy, aktuální zdravotní stav, urogenitální infekce, poškození chámovodů, koitální problémy
- další příčiny neplodnosti  
vyšší věk při početí, stres, užívání drog a léků, kuřáctví, alkoholismus, vliv životního prostředí



## Posun věkových kategorií u žen (1983-2003):



## Pravděpodobnost početí a neplodnosti u žen dle věkových kategorií:



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## Základní vyšetření při neplodnosti:

- Základní gynekologické vyšetření  
rodinná, osobní a gynekologická anamnéza, křivka bazálních teplot, mikroabrase endometria, mikrobiální obraz poševní, onkologická cytologie, kolposkopie, případně rentgenové vyšetření dělohy
- Specializované vyšetření  
laboratorní hormonální screening, vaginální ultrazvuk, vyšetření spermiogramu, případně komplexní diagnostická laparoskopie a hysteroskopie, genetické, imunologické či urologické vyšetření

# LÉKAŘSKY ASISTOVANÁ REPRODUKCE

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## ASISTOVANÁ REPRODUKCE

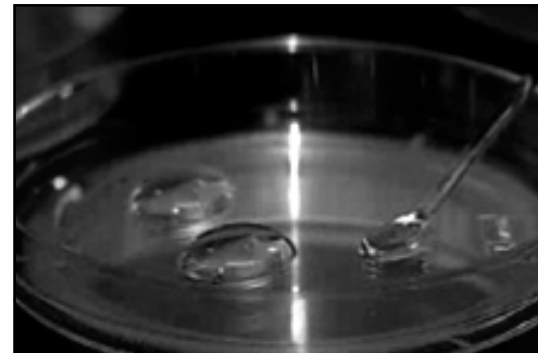
= jakýkoli medicínský zásah, který napomáhá lidskému rozmnožování

- chirurgické zákroky
- farmakoterapie (např. hormonální léčba)
- umělé oplodnění (artificial insemination, AI)  
oplodnění v organismu ženy
- oplodnění ve zkumavce (*in vitro* fertilization, IVF)  
oplodnění mimo organismus ženy

## Asistovaná reprodukce (AR)

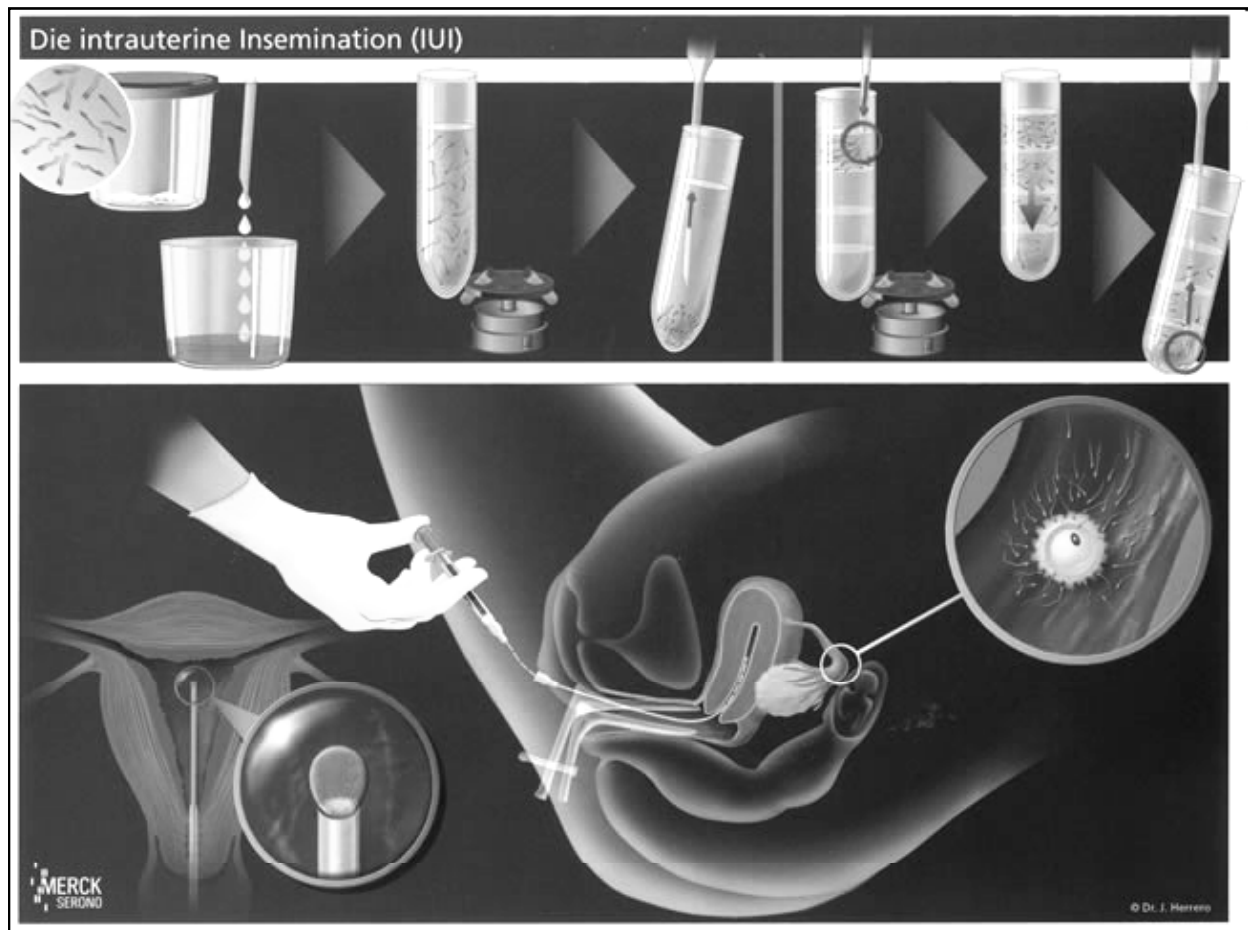
zahrnující manipulace s gametami, příp. s embryi:

- umělé oplodnění (artificial insemination, AI)  
IUI, GIFT
- oplodnění ve zkumavce (in vitro fertilization, IVF)  
IVF-ET , IVF-KET , ZIFT  
AH  
MESA , TESE  
PZD, SUZI  
ICSI , ROSNI



## AR homologní, heterologní:

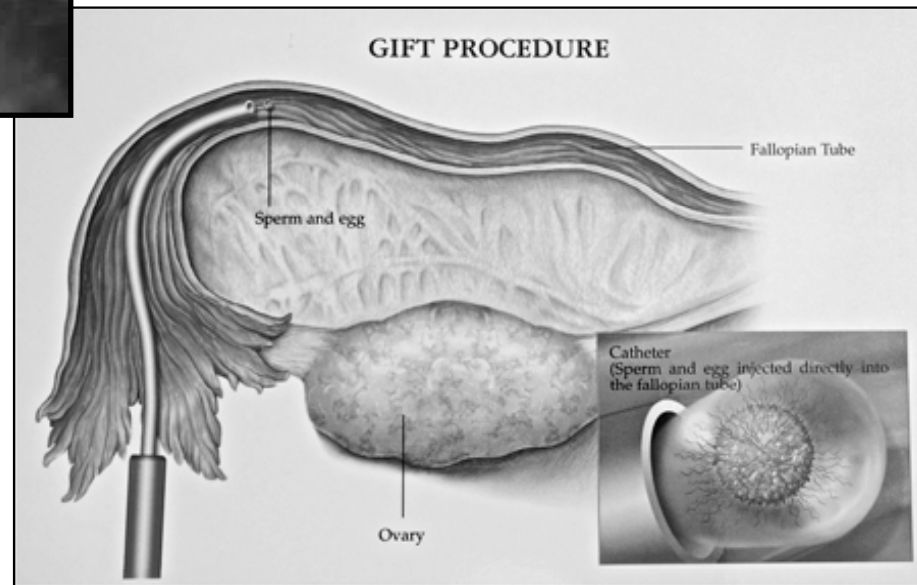
- intrauterinní inseminace (IUI)
  - intrafalopiánní transfer gamet (GIFT)
- 
- *in vitro* fertilizace (IVF)
    - chirurgický odběr spermií z nadvarlete (MESA) nebo varlete (TESE)
    - subzonální inzerce spermií (SUZI)
    - parciální disekce zony pellucidy (PZD)
    - injekce kulatého jádra spermatidy (ROSI)
    - intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI)
    - přenos embryí po rozmražení (KET)
    - intrafalopiánní transfer zygoty (ZIFT)
    - asistovaný hatching (AH)



## Intrauterinní inseminace (IUI)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012





## Intrafallopiánní transfer gamet (GIFT)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## Historický vývoj metod umělého oplodnění - IUI:

- experimenty probíhaly převážně v utajení (zásahy do reprodukce byly považovány za ostudné a nepřírozené)
- 1790 – Londýn (1866 – New York):  
první provedení homologní IUI
- 1884 – Philadelphia:  
první provedení heterologní IUI (zveřejněno 1909)
- 1953:  
první úspěšná IUI s využitím kryokonzervovaného spermatu

# *IN VITRO* FERTILIZACE (IVF)

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## Historický vývoj metod IVF:

- 1944 – první provedení IVF s lidskými gametami
- 1978 – narození prvního dítěte počatého metodou IVF
- 1982 – první dvojčata po IVF
- 1983 – narozeno první dítě po zamražení embrya
- 1985 – první případ náhradního mateřství
- 1988 – poprvé provedena preimplantační genetická diagnostika
- 1990 – poprvé použita metoda ICSI
- 1997 – první dítě ze zamraženého oocytu

## 1978 - Louise Brown (Velká Británie)



Československo: 1982 - GIFT  
1983 - IVF

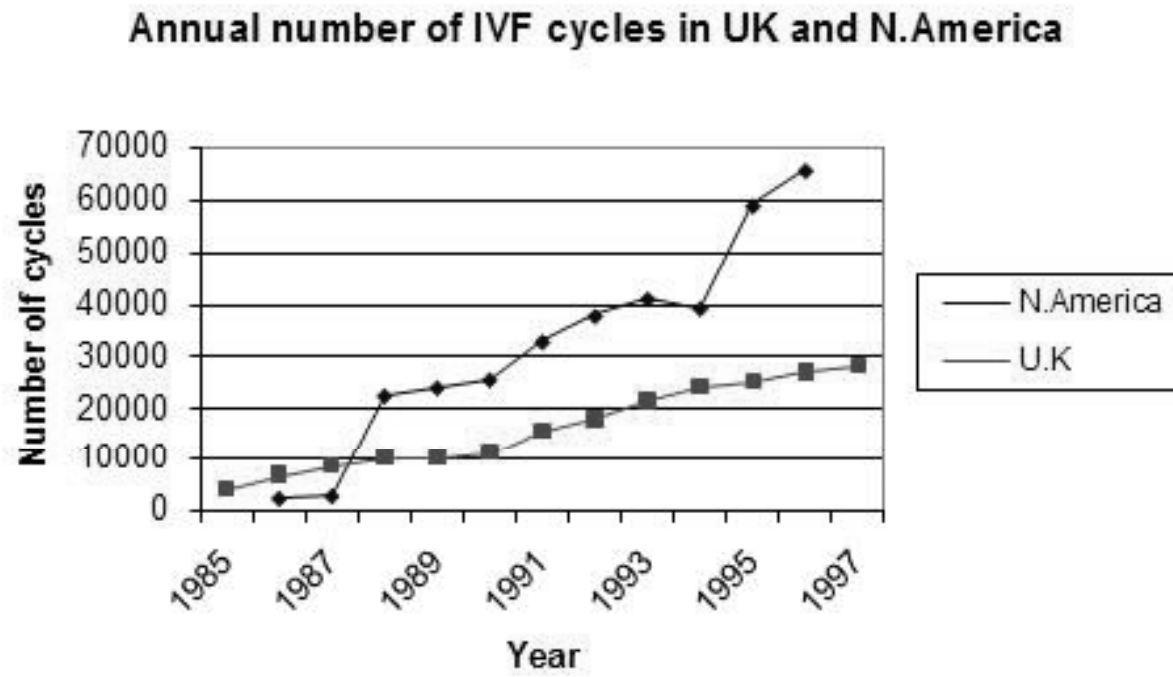
2010 – Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

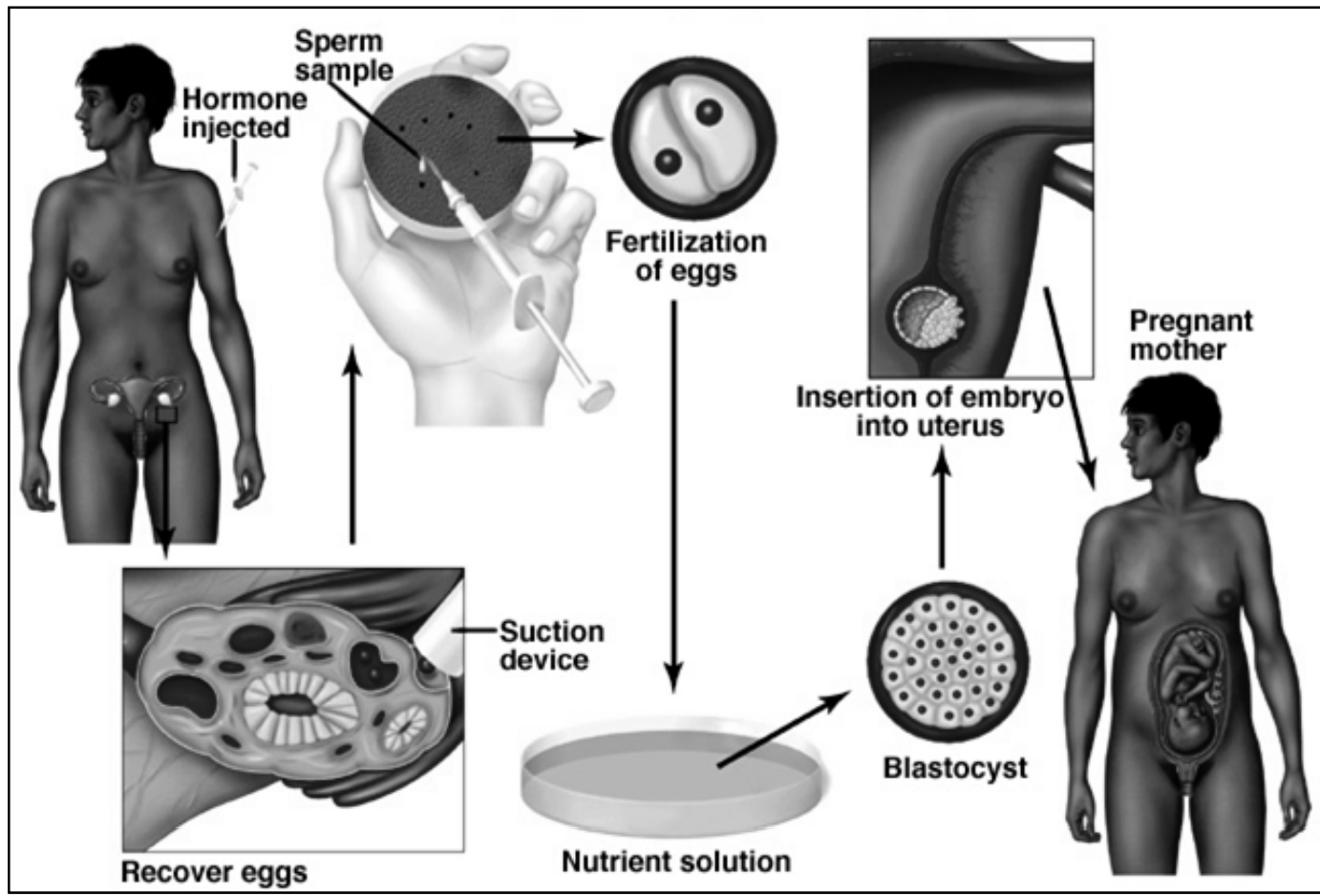
- Sir Robert G. Edwards

"for the development of *in vitro* fertilization"



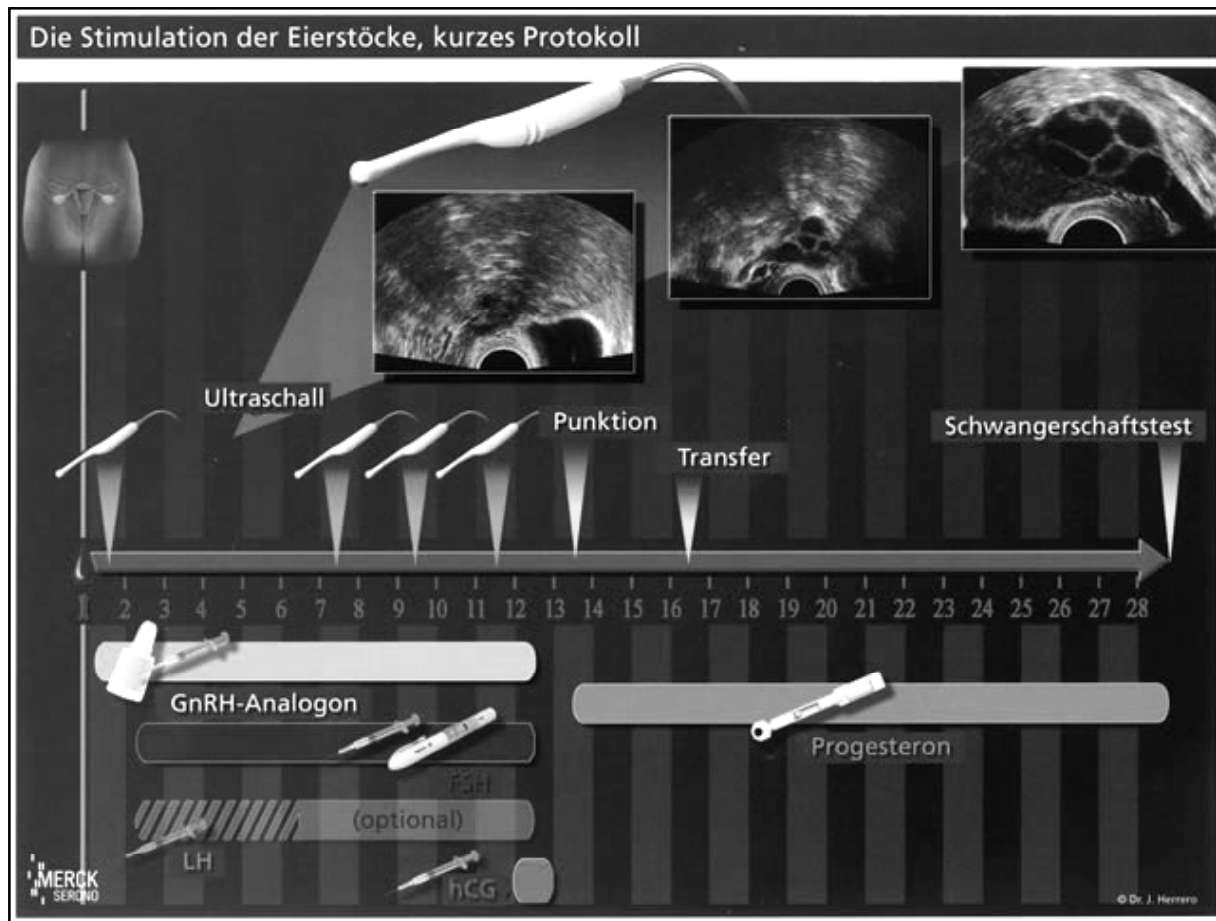
## Nárůst výkonů IVF v letech 1985-1998:





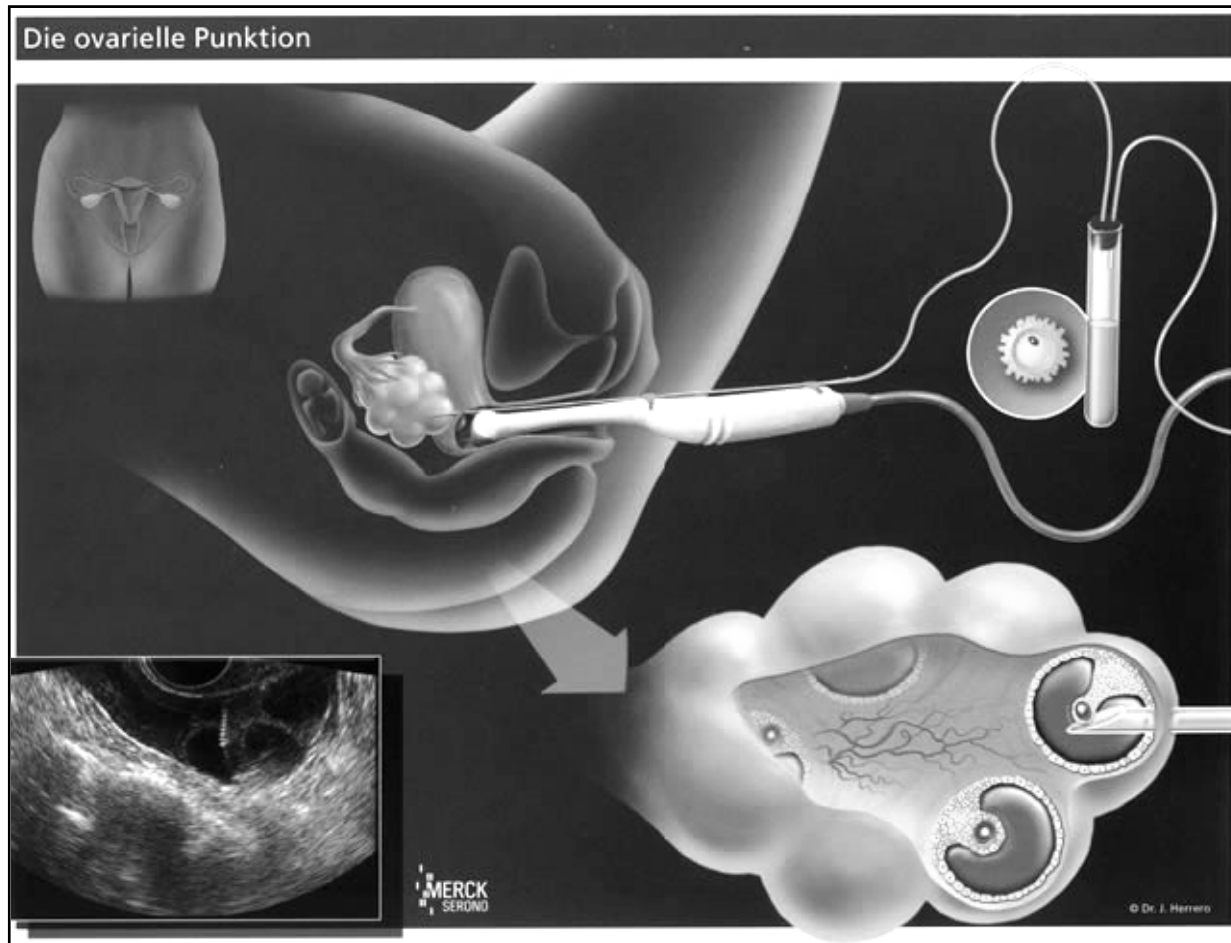
## Základní schéma IVF





## Příklad protokolu hormonální stimulace

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

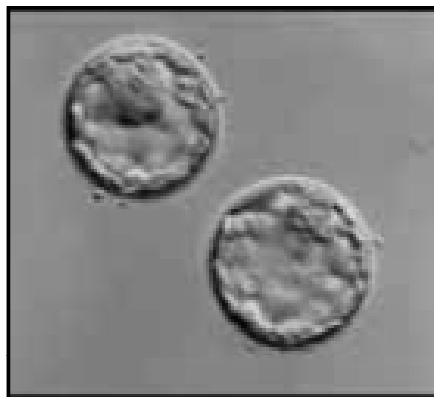


## Odběr oocytů po hyperovulaci

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

IVF / ICSI

ET

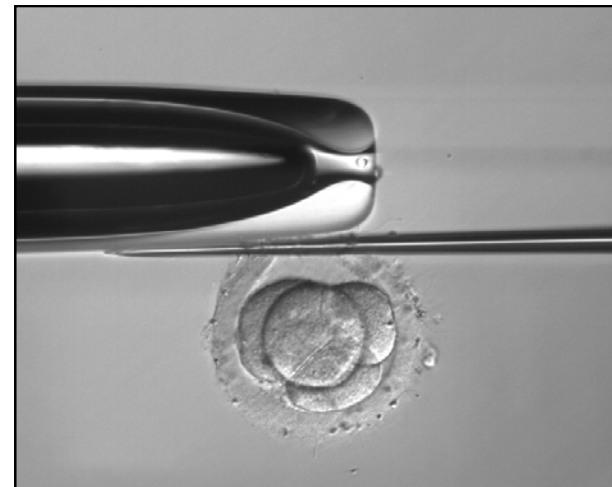
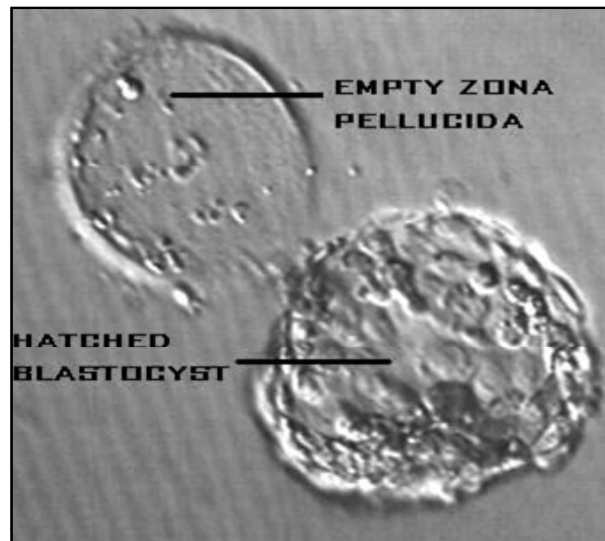


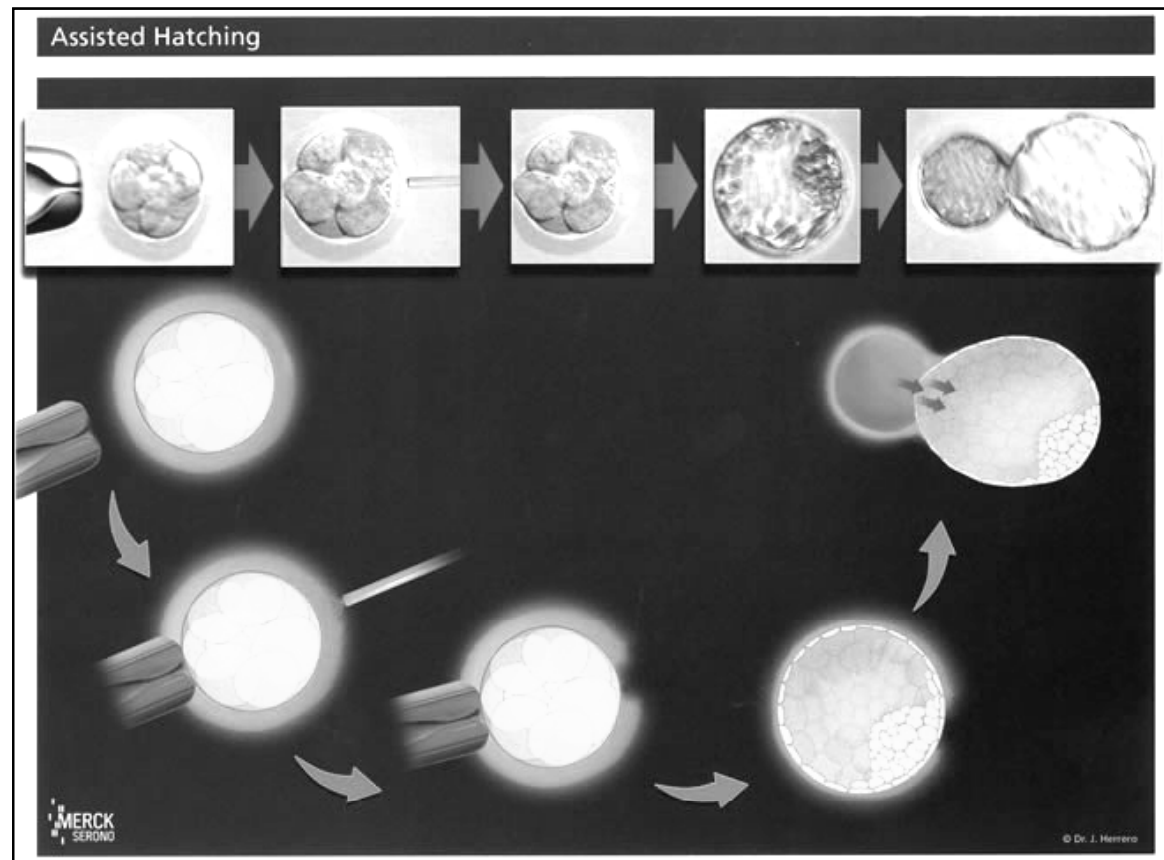
Prodloužená kultivace embryí  
(5 dní)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## Asistovaný hatching (AH)

- metody narušení ZP (>15 $\mu$ m):
  - mechanicky (mikrojuhla)
  - chemicky (enzymy)
  - laser





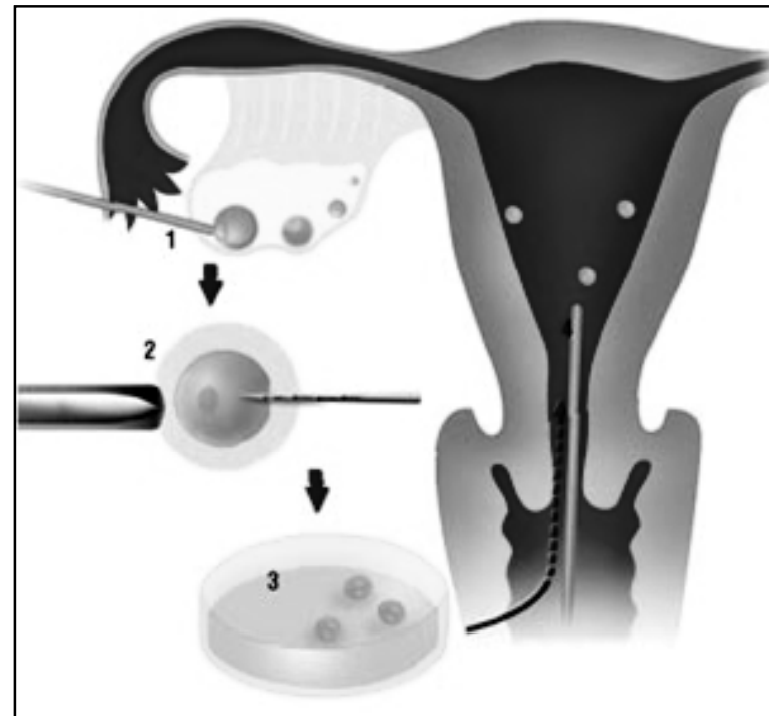
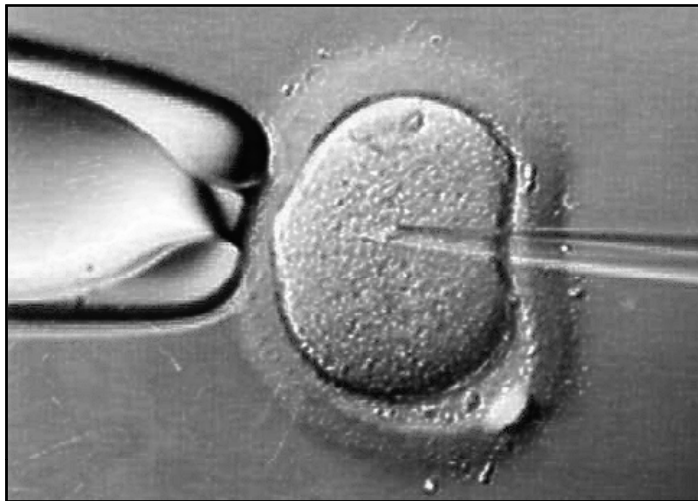
## Asistovaný hatching (AH)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## Indikace k AH:

- věk pacientky nad 35 let
- opakované nedosažení těhotenství po transferu kvalitních embryí
- zvýšená hodnota FSH u pacientky
- zjištění silnějšího obalu embrya
- na žádost pacientky

## Intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI)

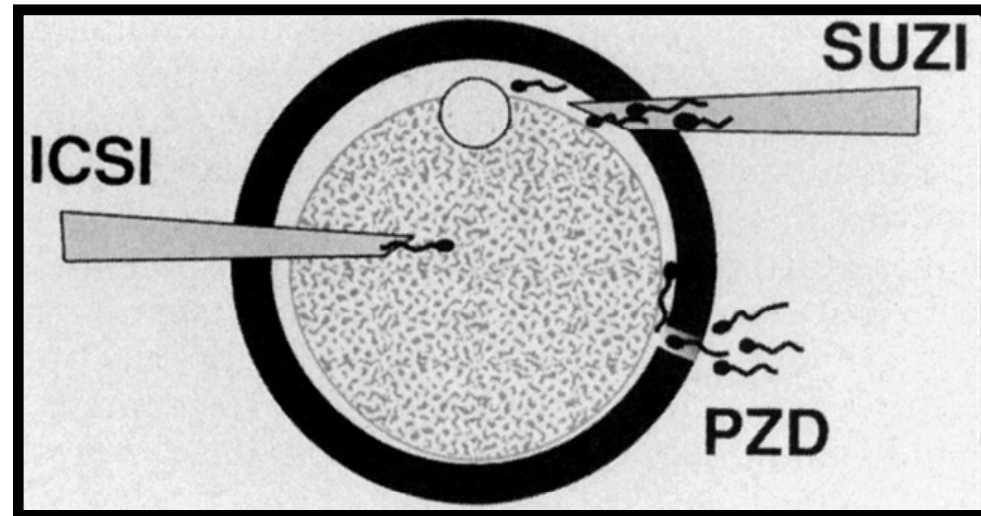
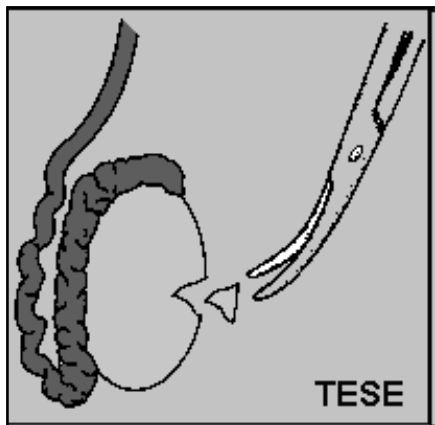
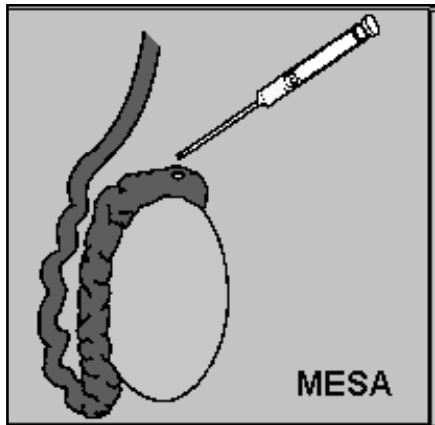


## Indikace k ICSI:

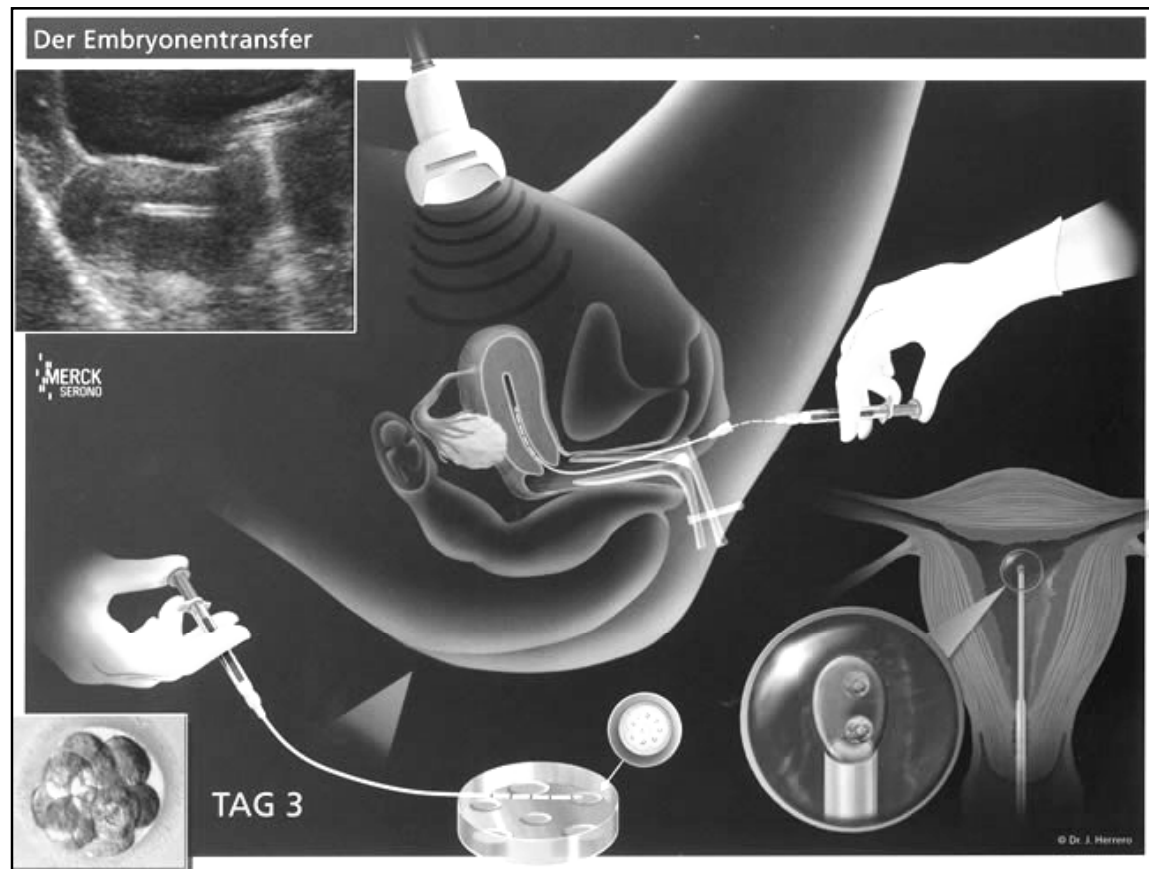
- selhání oplození vajíček v předchozích cyklech
- nízká koncentrace a pohyblivost spermií
- získání spermií chirurgickým odběrem z varlete nebo nadvarlete (= MESA/TESE)
- potřeba provedení preimplantační genetické diagnostiky (PGD)
- na žádost pacientky



## Metody pro léčbu poruch pohyblivosti spermií



mikromanipulační metody



Transfer embryí = ET (příp. KET)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

# Preimplantační genetická diagnostika (PGD, PID)

## Metody:

- biopsie  
(blastomer, blastocysty, polárního tělíka)
- genetické testy:  
cytogenetická analýza (FISH)  
molekulárně genetická diagnostika (PCR)
- eliminace embryí se specifikovanou vadou

PID se provádí obvykle v kombinaci s ICSI



Biopsie pólocytu pro účely PID



---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

## Indikace k PID:

- vrozená 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
  - opakovaná zástava vývoje embryí na prodloužené kultivaci
- 
- cytogenetika: 13, 18, 21, X, Y
  - molekulární genetiky: dle indikace / diagnózy

## Rizika spojená s IVF:

### Pro ženu:

- ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS), vícečetné gravidity
- torze vaječníků, mimoděložní gravidita, preeklampsie, SC, psychické problémy
- dlouhodobé riziko nádorových onemocnění ???

### Pro dítě:

- předčasný porod – (extrémně) nízká porodní váha
- riziko nádorových onemocnění ???



Contents lists available at ScienceDirect

## Placenta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/placenta](http://www.elsevier.com/locate/placenta)



### Follow-up of Children Born after ART

E. Basatemur, A. Sutcliffe\*

*Adolescent and General Paediatric Unit, Institute of Child Health, University College London, 250 Euston Road, 6th Floor, London NW1 2PQ, UK*

#### ARTICLE INFO

*Article history:*  
Accepted 13 August 2008

*Keywords:*  
Follow-up  
Assisted reproductive therapies  
ART  
In vitro fertilisation  
IVF  
Intracytoplasmic sperm injection  
ICSI

#### ABSTRACT

Assisted reproductive therapies (ART), namely in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), have become widely used in the treatment of human infertility. Children conceived using ART represent a substantial proportion of the population. Follow-up of these children is necessary in order to evaluate the risks of infertility treatment upon subsequently conceived offspring. In recent years there has been considerable work in this field. This review summarises current evidence regarding the health of children conceived following ART, encompassing neonatal outcomes, the risk of congenital malformations, neurodevelopmental outcome, physical health, psychosocial well being, and the risk of cancer. The main risks for the future well being of ART children remain multiple pregnancies and low birth weight. Evidence regarding the outcome of singletons born at term following ART is generally reassuring. It is essential that follow-up of ART children continues as they progress through adolescence into adulthood.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.





Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology  
Vol. 21, No. 1, pp. 67–81, 2007  
doi:10.1016/j.bpobgyn.2006.08.004  
available online at <http://www.sciencedirect.com>



5

---

## Outcomes of IVF conceptions: are they different?

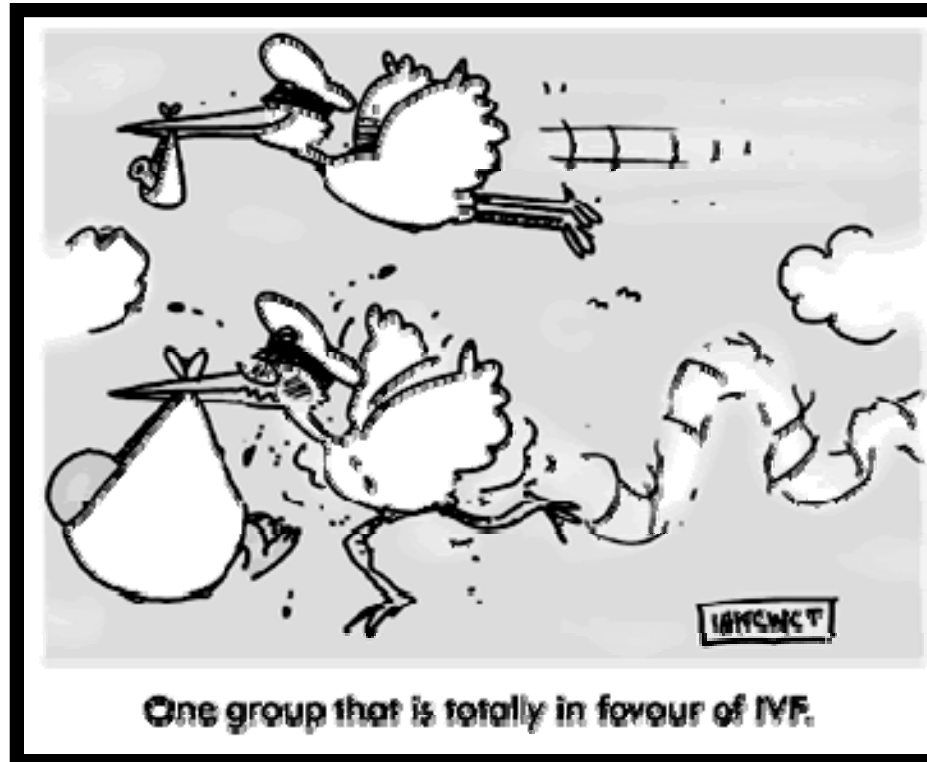
Jane Halliday\* BSc(Hons), PhD

Associate Professor

*Public Health Genetics, Murdoch Childrens Research Institute, Parkville, 3052 Victoria, Australia*

---

Perinatal outcomes, such as preterm delivery, low birth weight and some obstetric complications, are increased significantly after in-vitro fertilization (IVF) compared with spontaneously



One group that is totally in favour of IVF.

# KLONOVÁNÍ ČLOVĚKA

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

# Klonování člověka

Reprodukční klonování (Reproductive Cloning):

- přenos embrya, vzniklého metodou SCNT, do dělohy ženy, následné těhotenství a narození dítěte

Terapeutické klonování (Research Cloning):

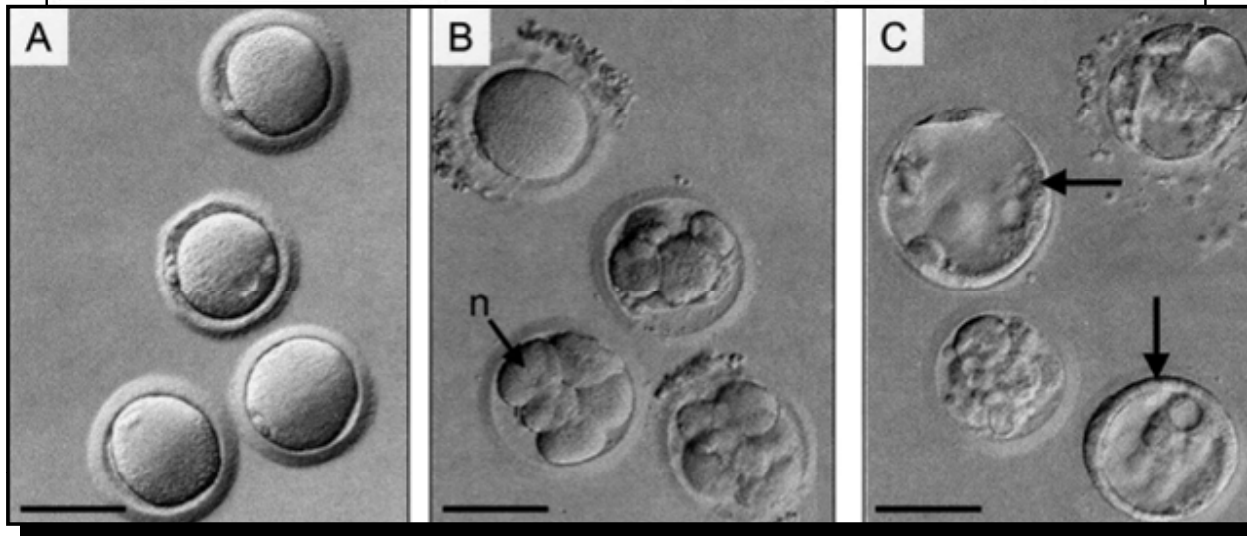
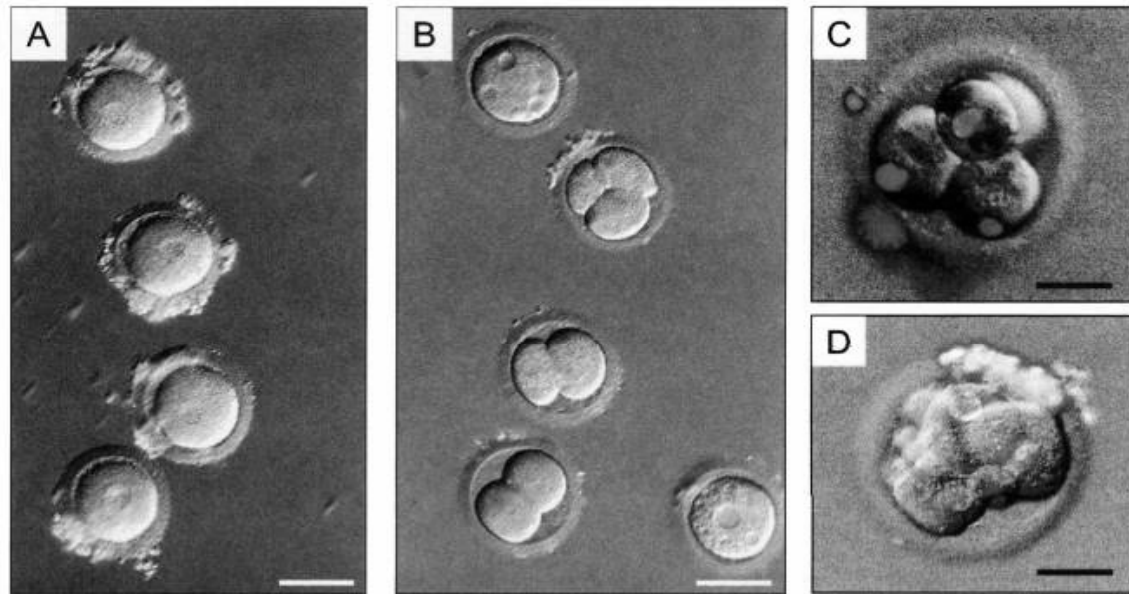
- embryo, vzniklé metodou SCNT, udržováno v podmínkách *in vitro*
- výzkum (genetická kontrola diferenciac)
- izolace ESCs a indukovaná diferenciac (buněčná terapie bez problémů s imunokompatibilitou)

Tvorba cybridů

2001:

Cibelli et al. (Advanced Cell Technology)

- 19 rekonstruovaných embryí metodou SCNT:  
3 embrya schopna buněčného dělení (max. 6 buněk)
- 22 oocytů aktivováno partenogeneticky:  
6 embryí se dělilo až do stádia blastocysty



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

Hwang WS et al.:

Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst.

Science 303, 1669-1674, 2004

- ES morfologie, normální karyotyp
- embryonální markery
- schopnost diferenciacie *in vitro*
- 70 pasáží *in vitro*

Hwang WS et al.:

Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocyst.

Science 308, 1777-1783, 2005



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012





---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012

Home > Science Magazine > Science Express > Hwang et al.

**Article Views**

- › Abstract
- › Full Text (PDF)
- › Supporting Online Material
- › Correction

VERSION HISTORY

- › 308/5729/1777 (most recent)
- › **1112286v1**
- › Correction for this article

**Related Content**

- In Science Magazine**
- › Science Letter by Kennedy
- › Science News of the Week by Vogel

- In Other Science Products**  
(Separate subscription may be required)
- › News story by Vogel

- ▼ More Information on Related Content

**Article Tools**

Manage This Article

Performing your original search, "Hwang WS", in Science will retrieve 0 results.

Published Online May 19, 2005  
Science DOI: 10.1126/science.1112286

◀ Science Express Index

REPORTS

**This article has been retracted**

Submitted on March 15, 2005  
Accepted on May 12, 2005

**Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts**

Woo Suk Hwang<sup>1\*</sup>, Sung Il Roh<sup>2</sup>, Byeong Chun Lee<sup>3</sup>, Sung Keun Kang<sup>3</sup>, Dae Kee Kwon<sup>3</sup>, Sue Kim<sup>3</sup>, Sun Jong Kim<sup>2</sup>, Sun Woo Park<sup>3</sup>, Hee Sun Kwon<sup>3</sup>, Chang Kyu Lee<sup>4</sup>, Jung Bok Lee<sup>2</sup>, Jin Mee Kim<sup>2</sup>, Curie Ahn<sup>5</sup>, Sun Ha Paek<sup>5</sup>, Sang Sik Chang<sup>6</sup>, Jung Jin Koo<sup>6</sup>, Hyun Soo Yoon<sup>7</sup>, Jung Hye Hwang<sup>7</sup>, Youn Young Hwang<sup>7</sup>, Ye Soo Park<sup>7</sup>, Sun Kyung Oh<sup>5</sup>, Hee Sun Kim<sup>5</sup>, Jong Hyuk Park<sup>8</sup>, Shin Yong Moon<sup>5</sup>, Gerald Schatten<sup>8\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

<sup>2</sup> Medical Research Center, MizMedi Hospital, Seoul, 135-280, Korea.

<sup>3</sup> College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

<sup>4</sup> School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

<sup>5</sup> College of Medicine, Seoul National University, Seoul, 110-744, Korea.

<sup>6</sup> Hanna Women's Clinic, Seoul, 137-872, Korea.

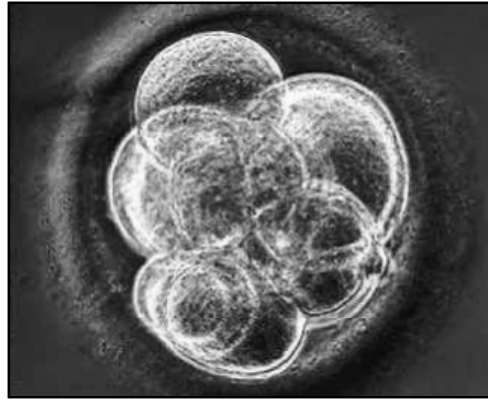
<sup>7</sup> School of Medicine, Hanyang University, Seoul, 471-701, Korea.

<sup>8</sup> Pittsburgh Development Center, Magee-Womens Research Institute, Departments of Obstetrics-Gynecology-Reproductive Sciences and Cell Biology-Physiology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213 USA.



---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 11 / 2.5.2012



- 2005 - terapeutické klonování člověka povoleno ve Velké Británii
- 2006 - první úspěšné provedení SCNT na lidských buňkách (UK)
- 2008 - "hybridní" embryo (cybrid): enukleovaný oocyt živočišného původu, jádro lidské somatické buňky)
- 2003: Čína



"Holy great mother of God, I've been cloned!"