

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 23.3.2015

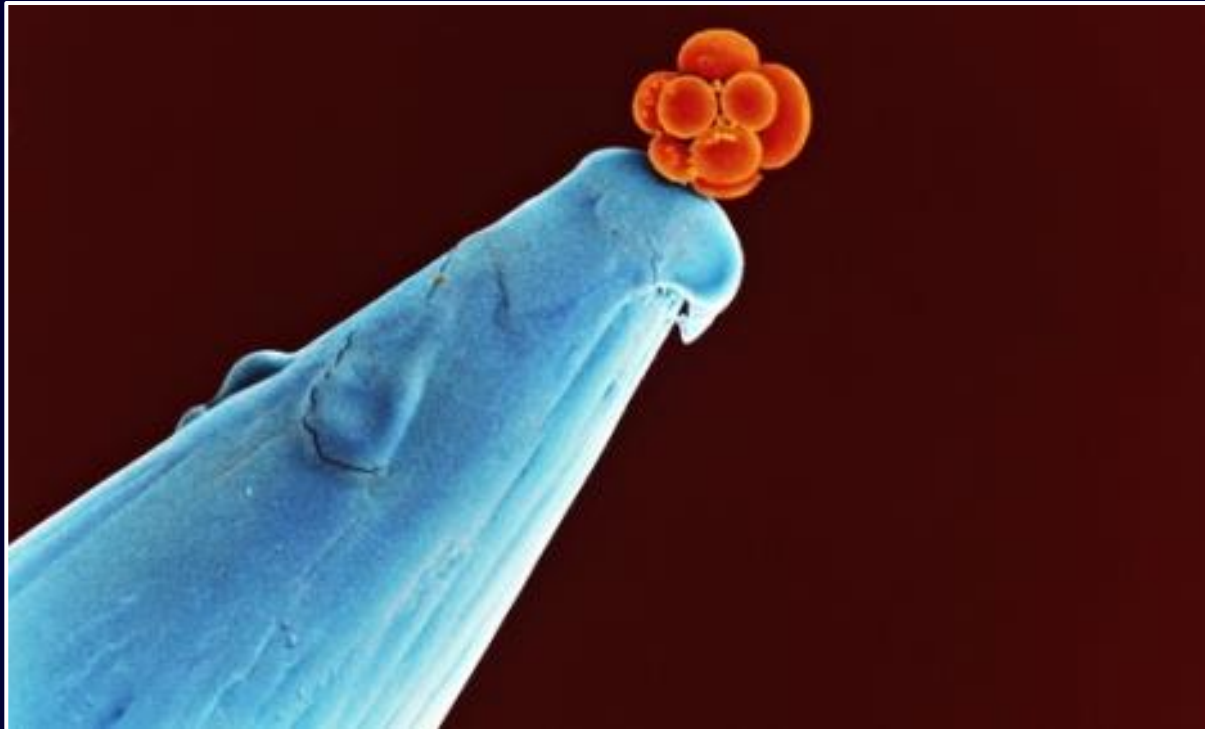
Lékařsky asistovaná reprodukce

prof. 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



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 a modifikace IVF
- klonování člověka
klonování pro výzkumné účely / terapeutické klonování
reprodukční klonování
- příprava umělých gamet



NEPLODNOST A JEJÍ PŘÍČINY

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)

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

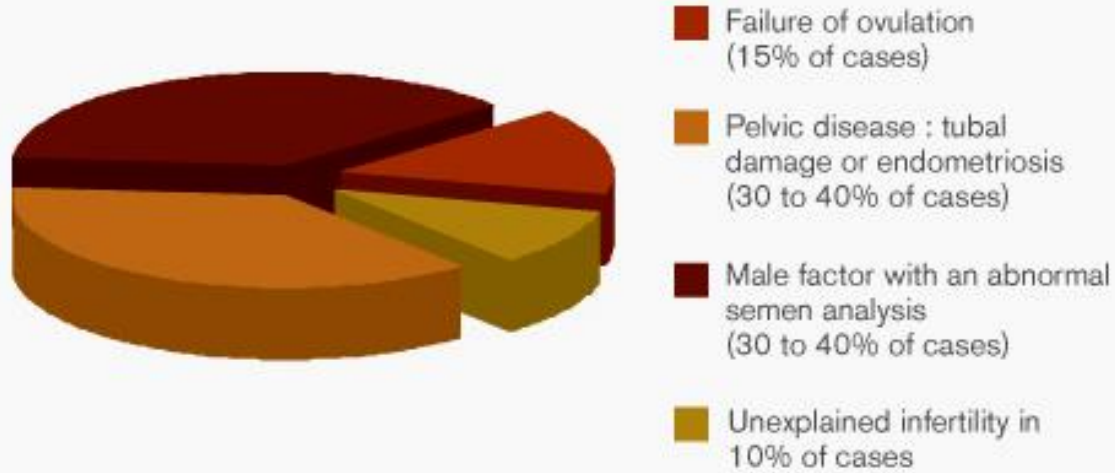
Pravidelné spontánní potraty / kojenecká úmrtnost

= úmrtnost živě narozených dětí před dosažením pátého roku života

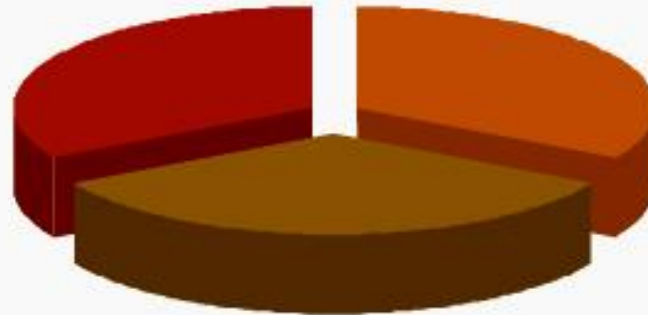
"Neobjasněná neplodnost"

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

Příčiny neplodnosti:



- 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.



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

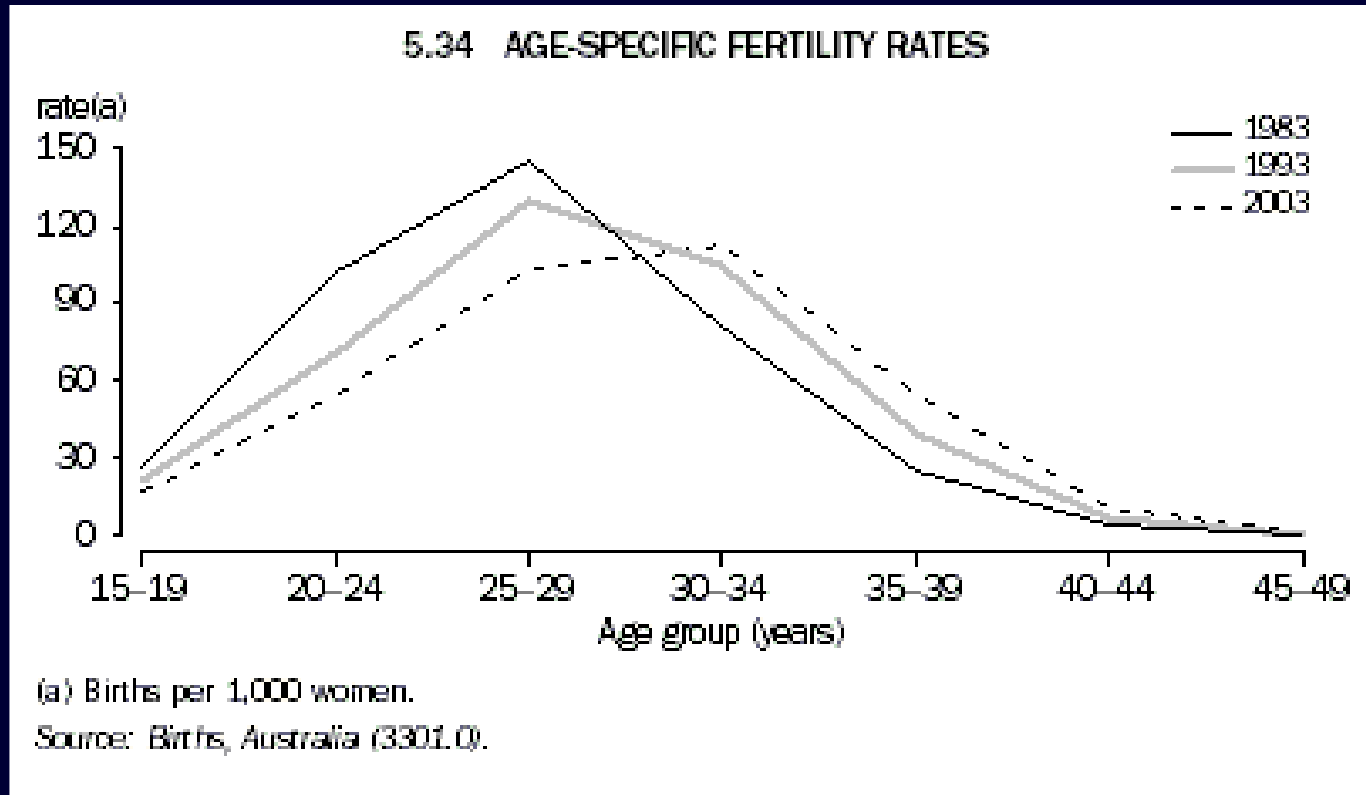
- **mužská neplodnost**

nízká kvalita spermatu, autoimunitní problémy, aktuální zdravotní stav, urogenitální infekce, poškození chámovodů, koitální problémy

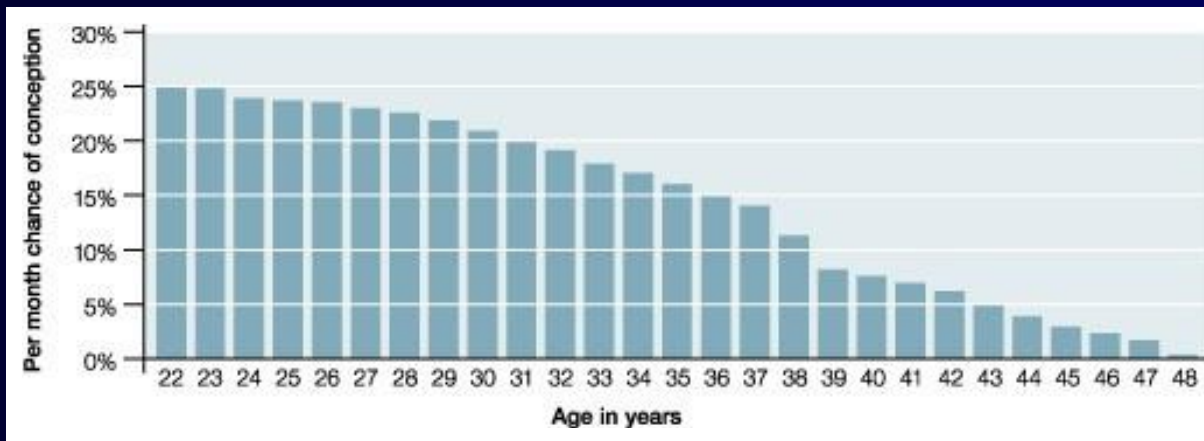
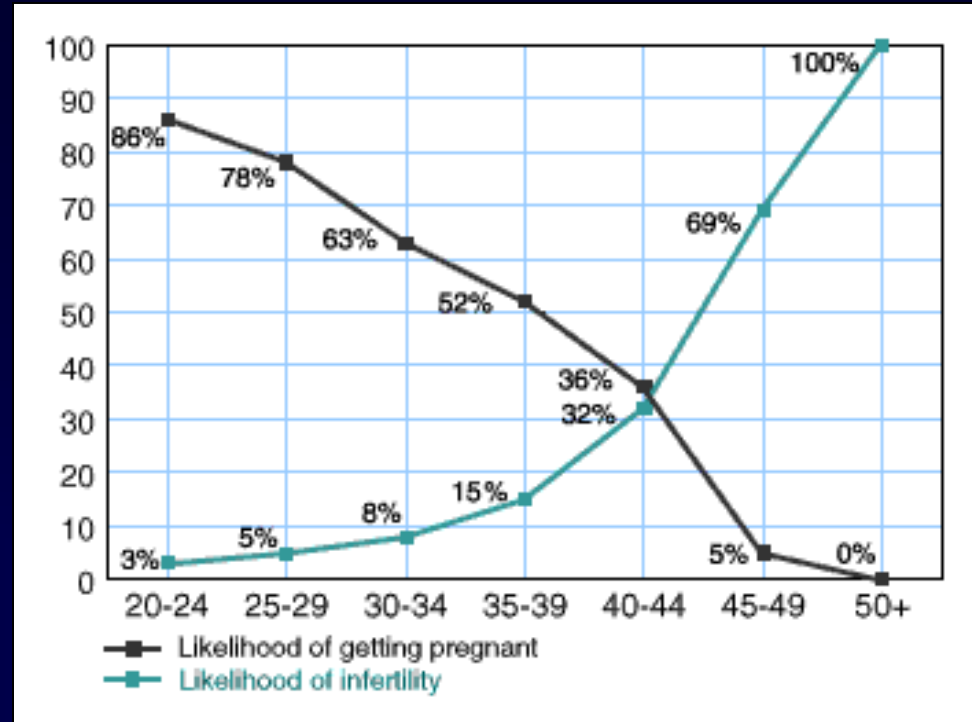
- **další příčiny neplodnosti**

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:



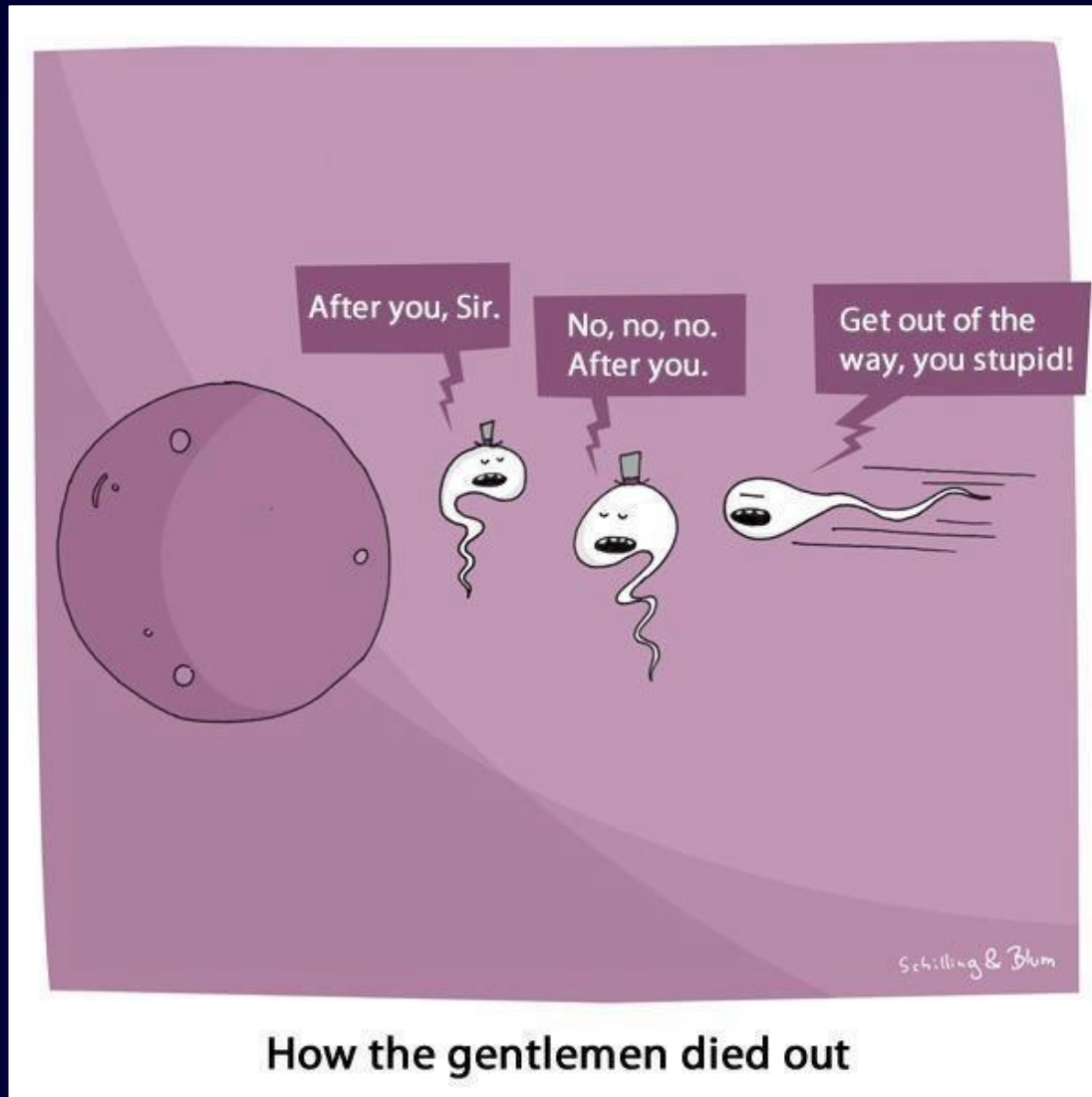
Základní vyšetření při neplodnosti:

- **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

ASISTOVANÁ REPRODUKCE

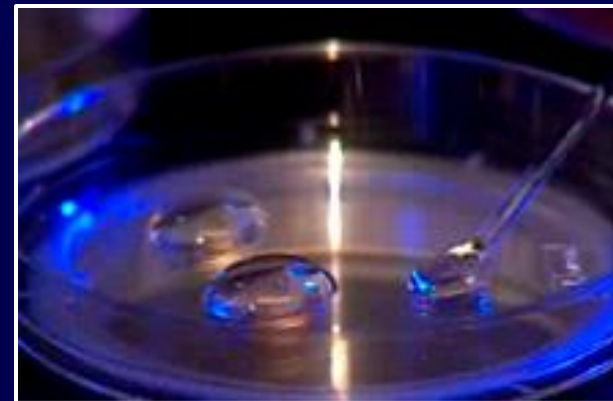
= jakýkoli medicínský zásah, který napomáhá lidskému rozmnožování

- 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)

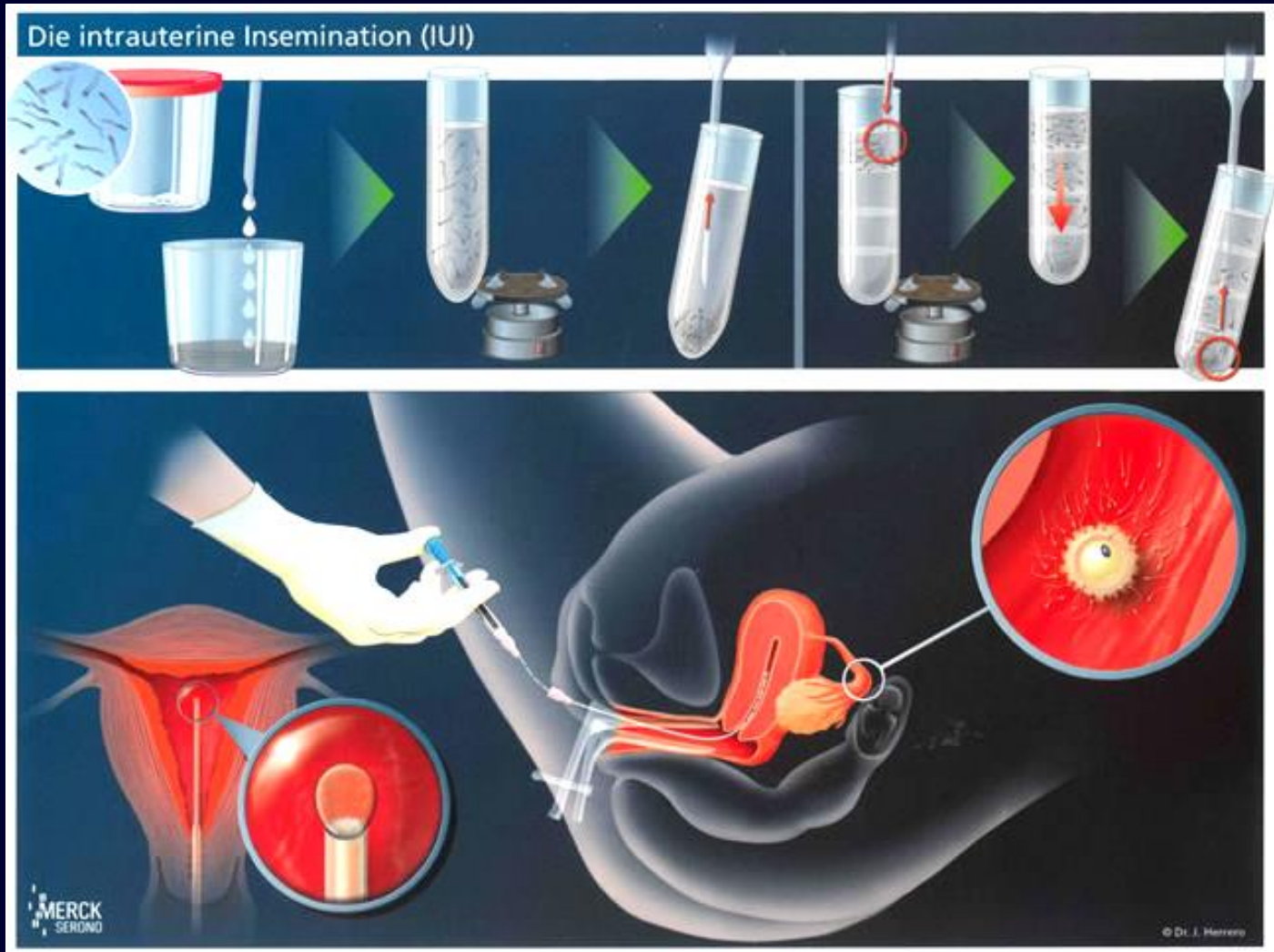
zahrnující manipulace s gametami, příp. s embryi:

- **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

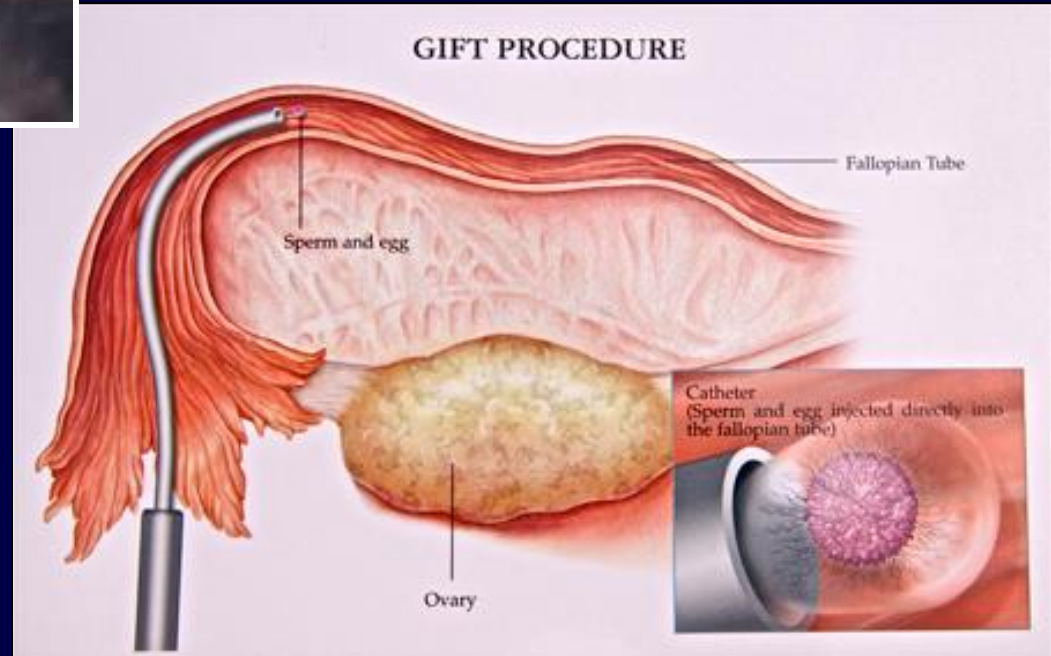


AR homologní, heterologní:

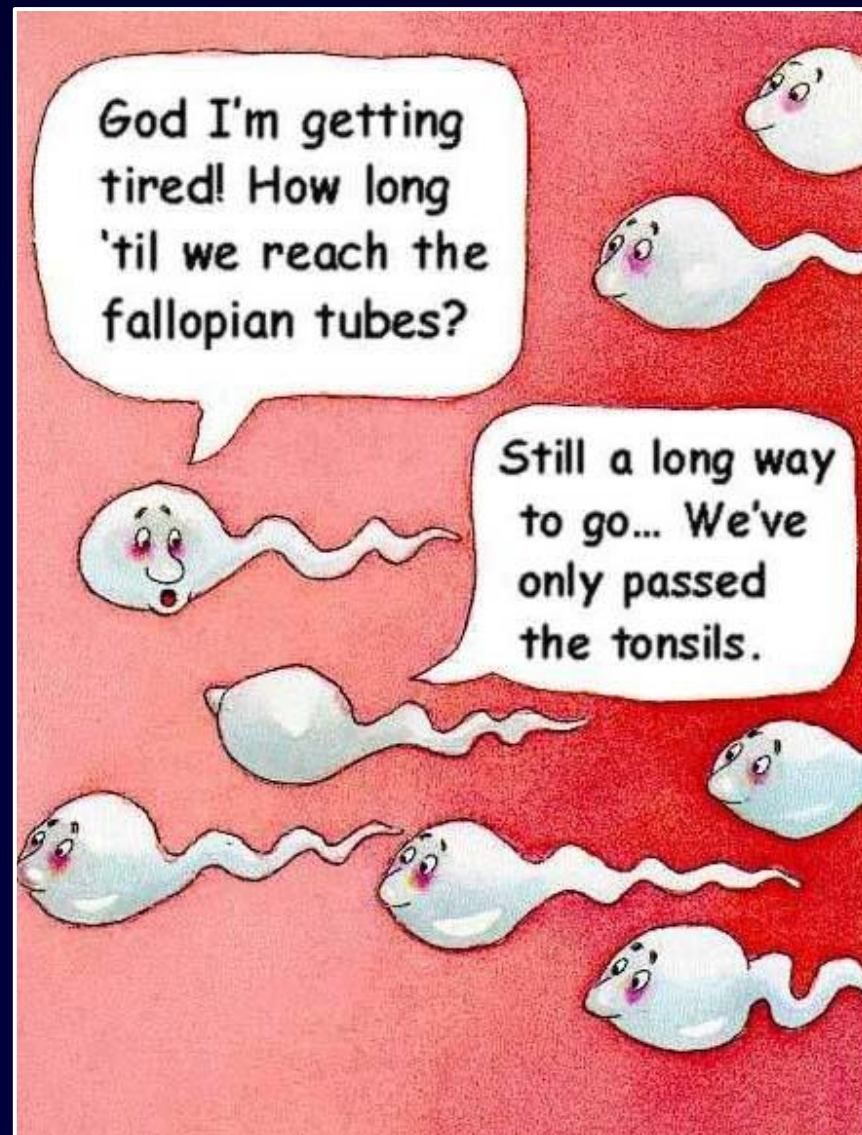
- **umělé oplodnění (AI)**
 - intrauterinní inseminace (IUI)
 - intrafalopiánní transfer gamet (GIFT)
- ***in vitro* fertilizace (IVF)**
 - chirurgický odběr spermií z nadvarlete (MESA) nebo varlete (TESE)
 - subzonální inzerce spermií (SUZI)
 - parciální disekce zony pellucidy (PZD)
 - injekce kulatého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



Intrauterinní inseminace (IUI)



Intrafallopiánní transfer gamet (GIFT)



Historický vývoj metod umělého oplodnění - IUI:

- experimenty probíhaly převážně v utajení (zásahy do reprodukce byly považovány za ostudné a nepřirozené)
- **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)

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

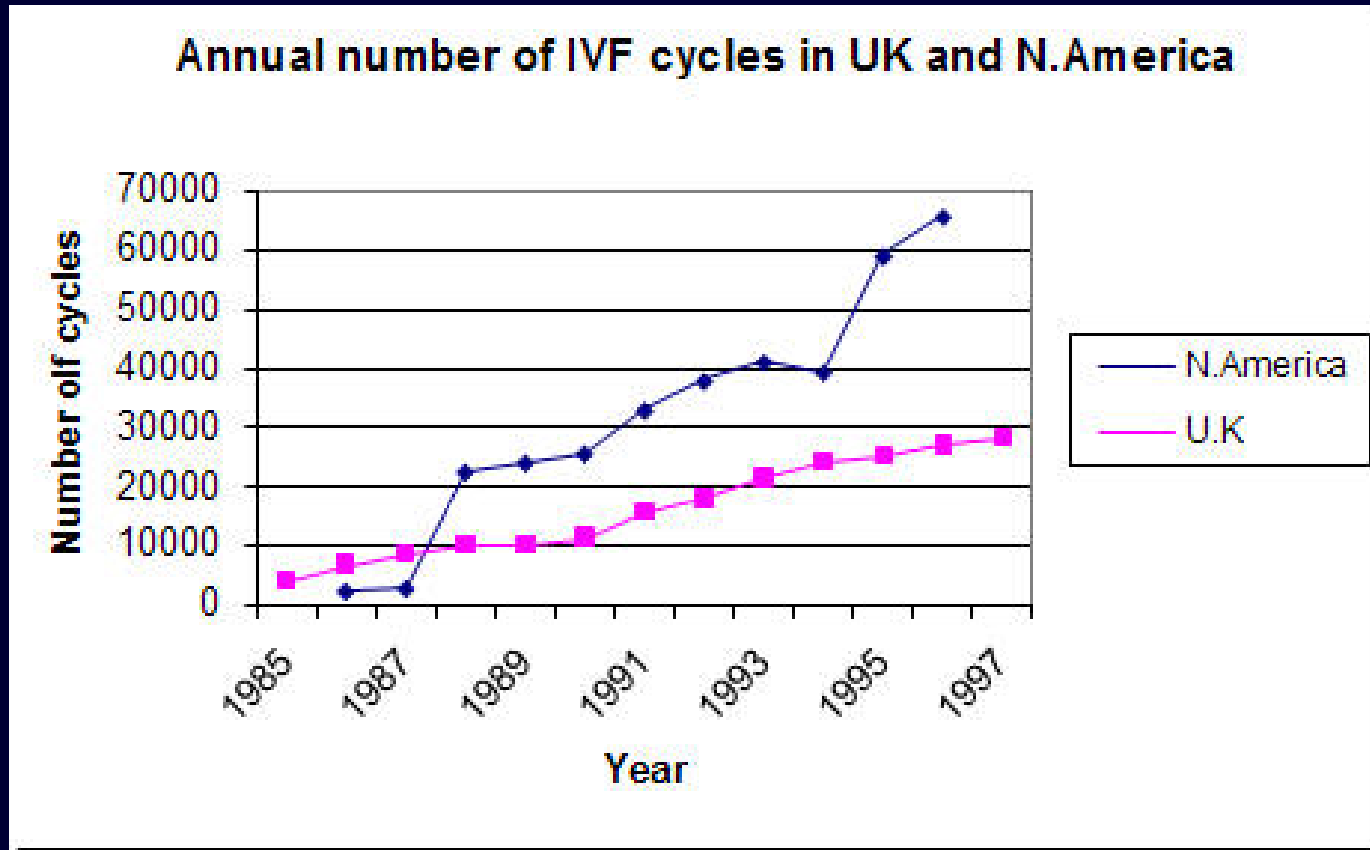
2010 – Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

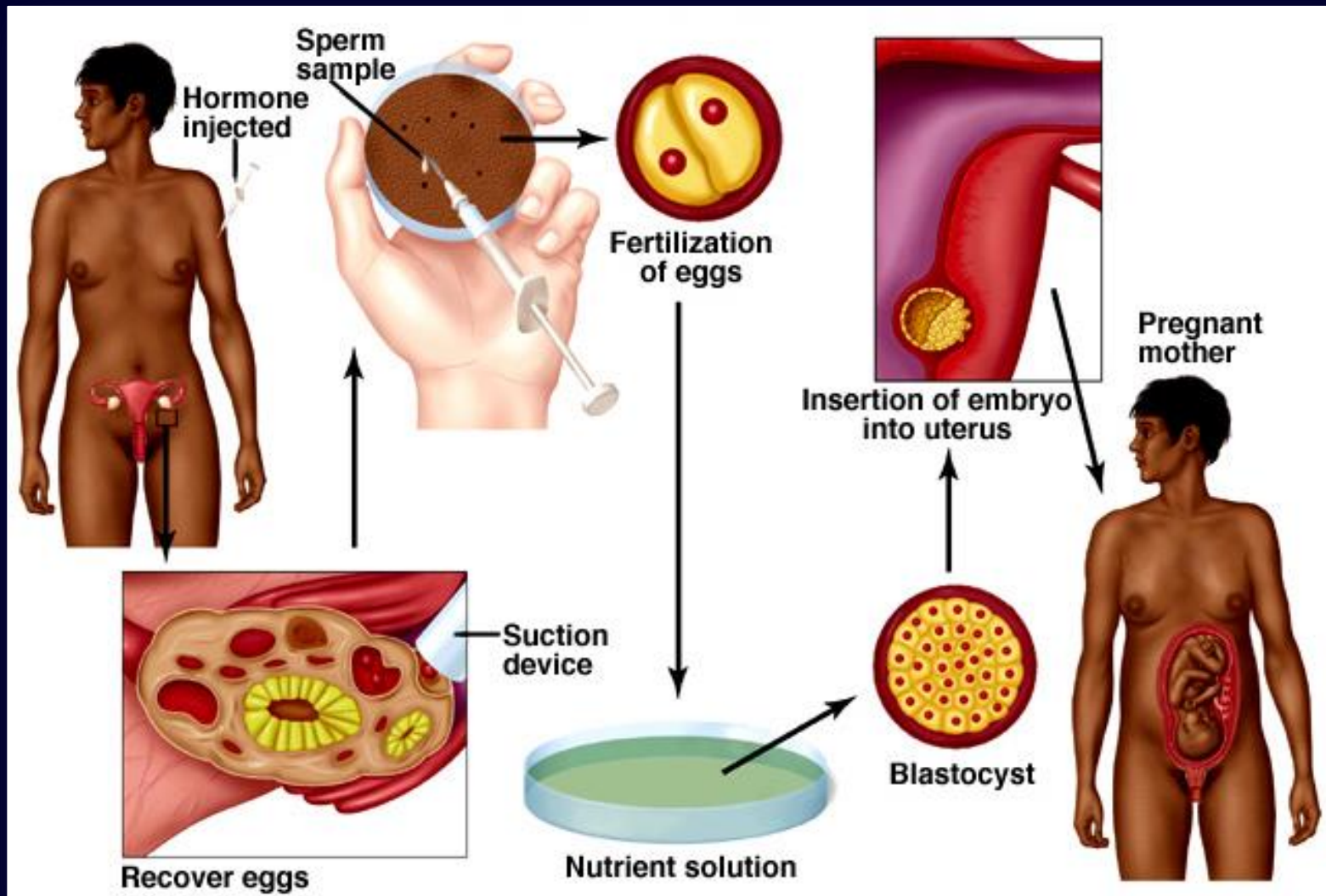
- Sir Robert G. Edwards

"for the development of *in vitro* fertilization"



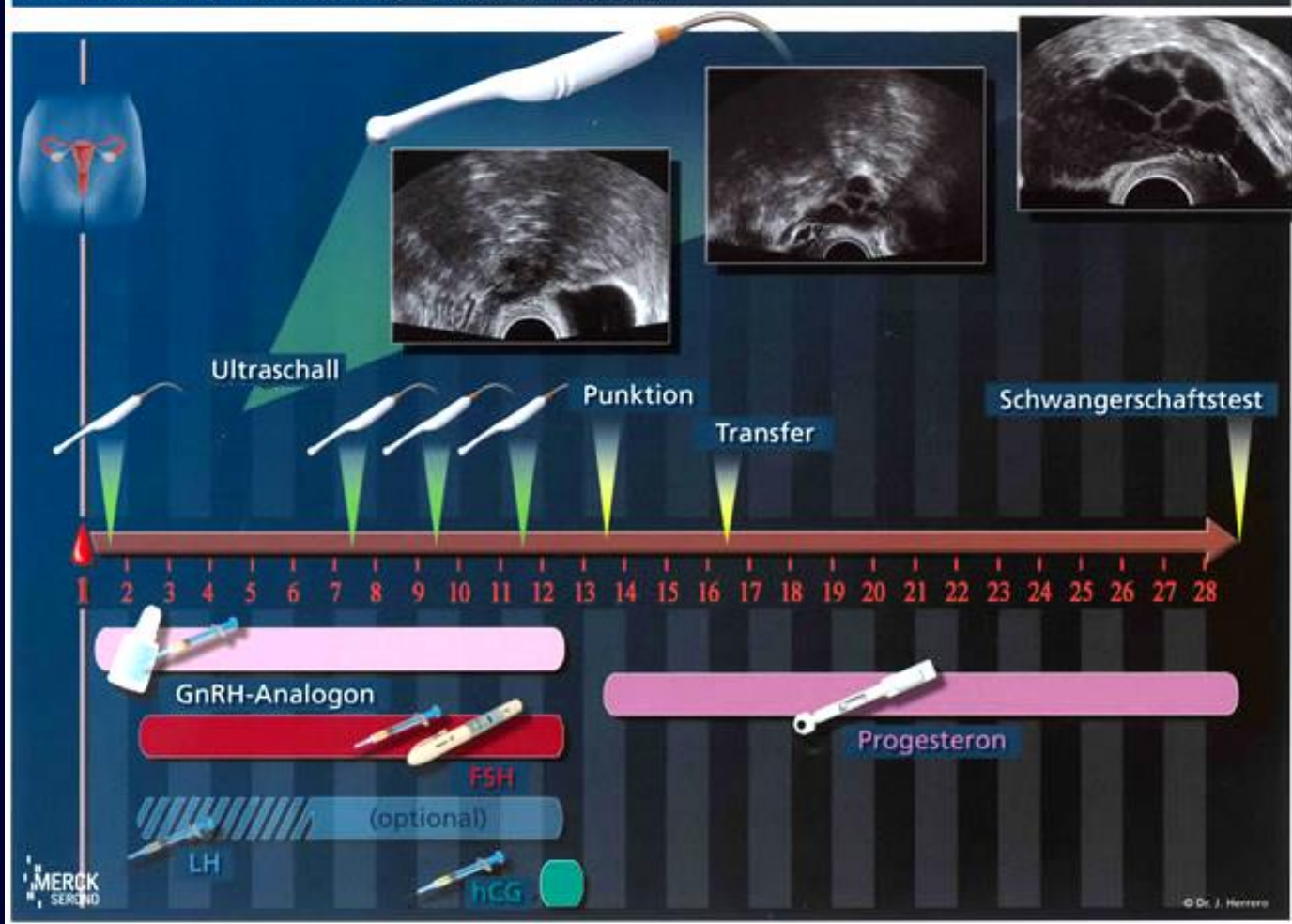
Nárůst výkonů IVF v letech 1985-1998:



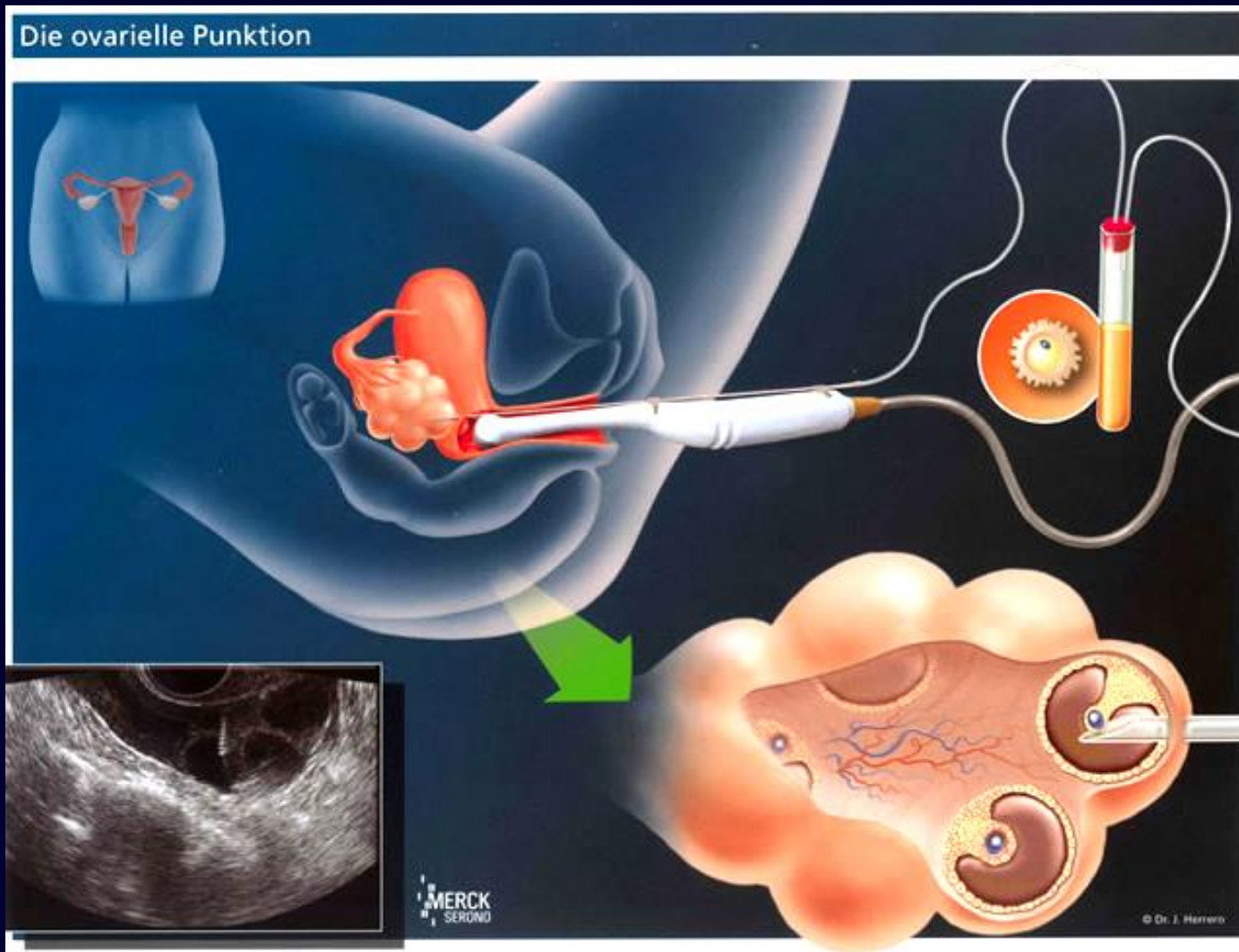


Základní schéma IVF

Die Stimulation der Eierstöcke, kurzes Protokoll



Příklad protokolu hormonální stimulace



Odběr oocytů po hyperovulaci

IVF / ICSI

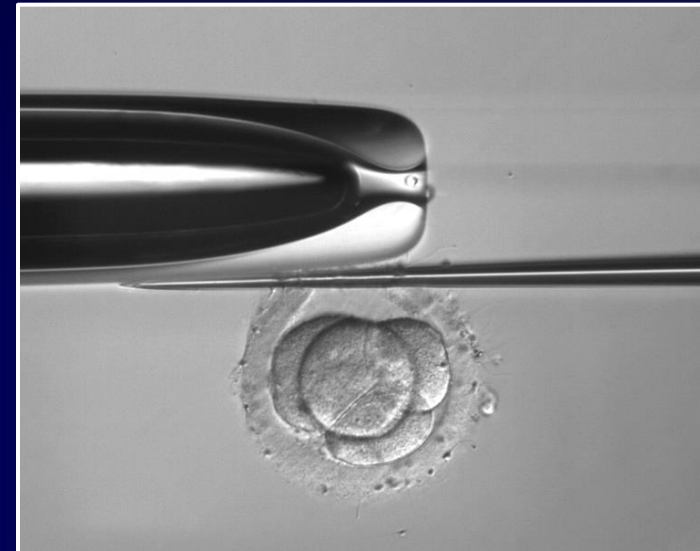
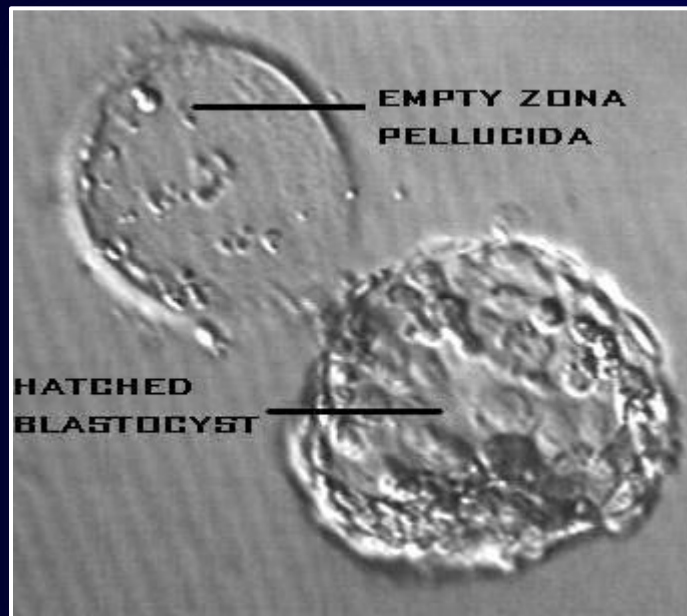
ET

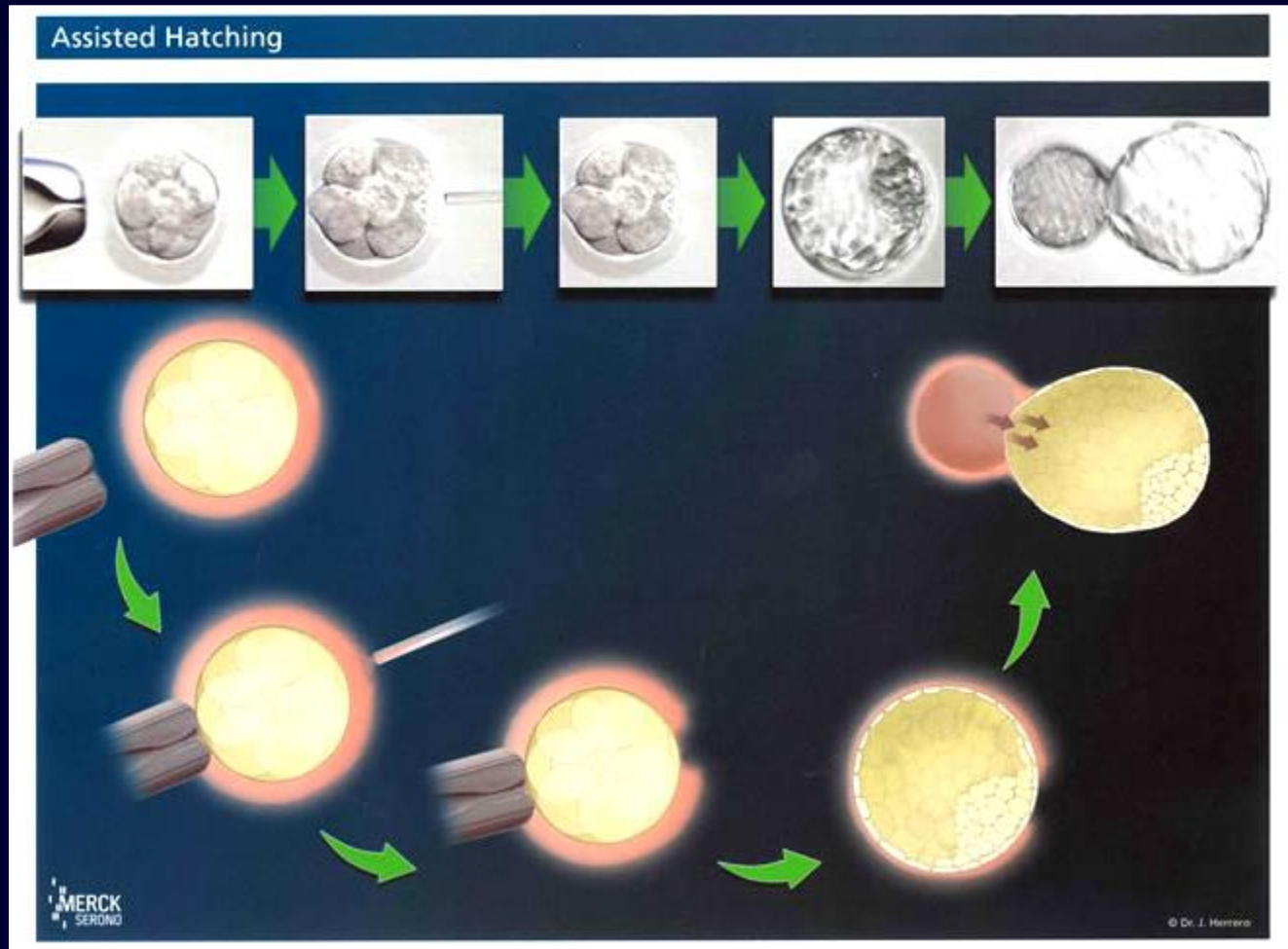


Prodloužená kultivace embryí
(5 dní)

Asistovaný hatching (AH)

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



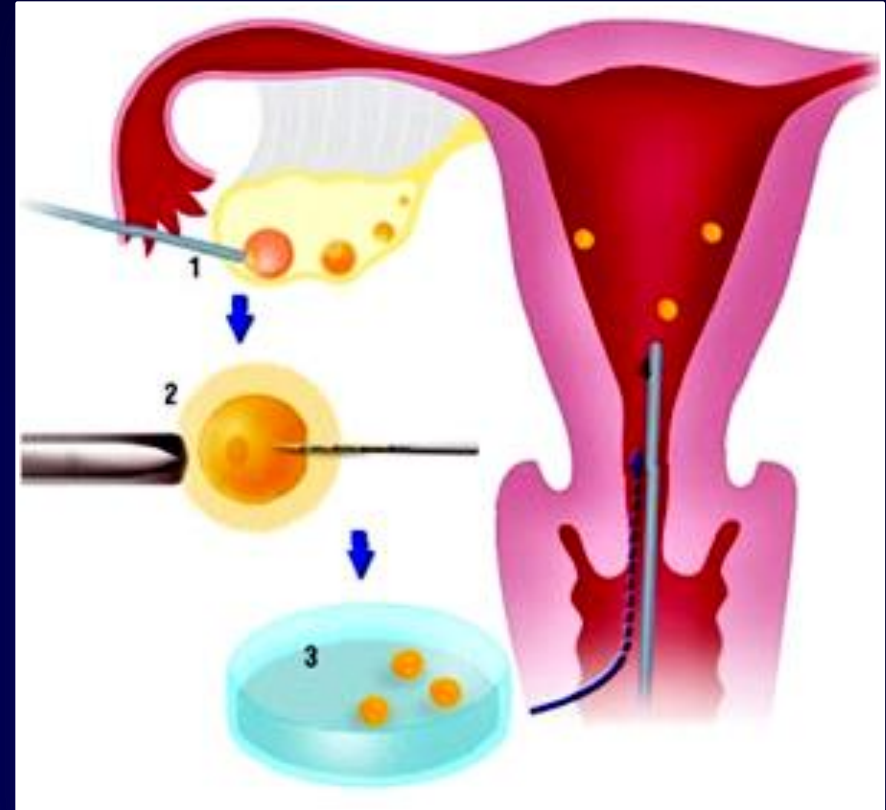


Asistovaný hatching (AH)

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

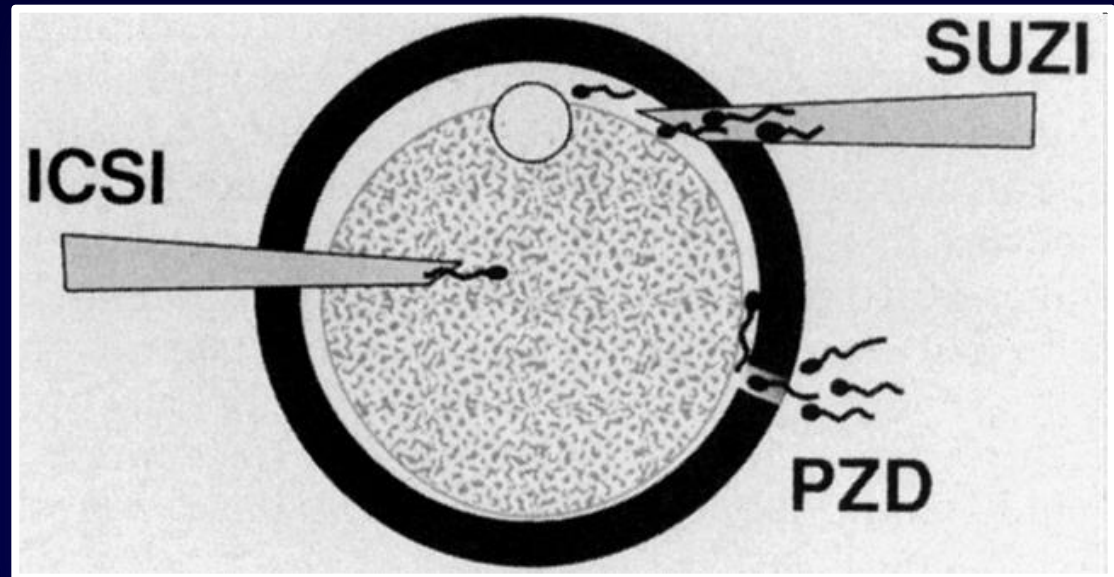
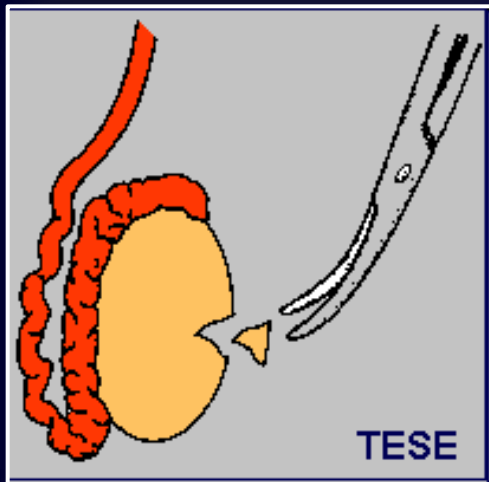
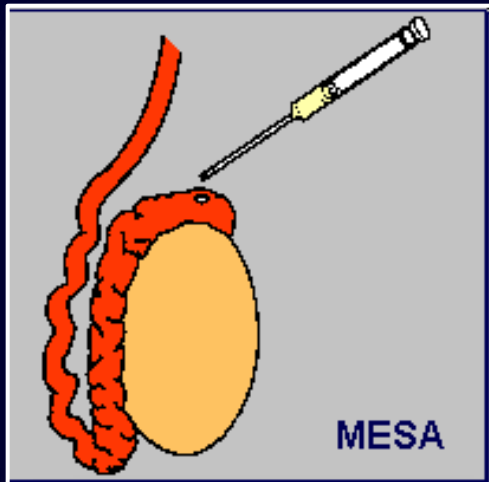
Intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI)



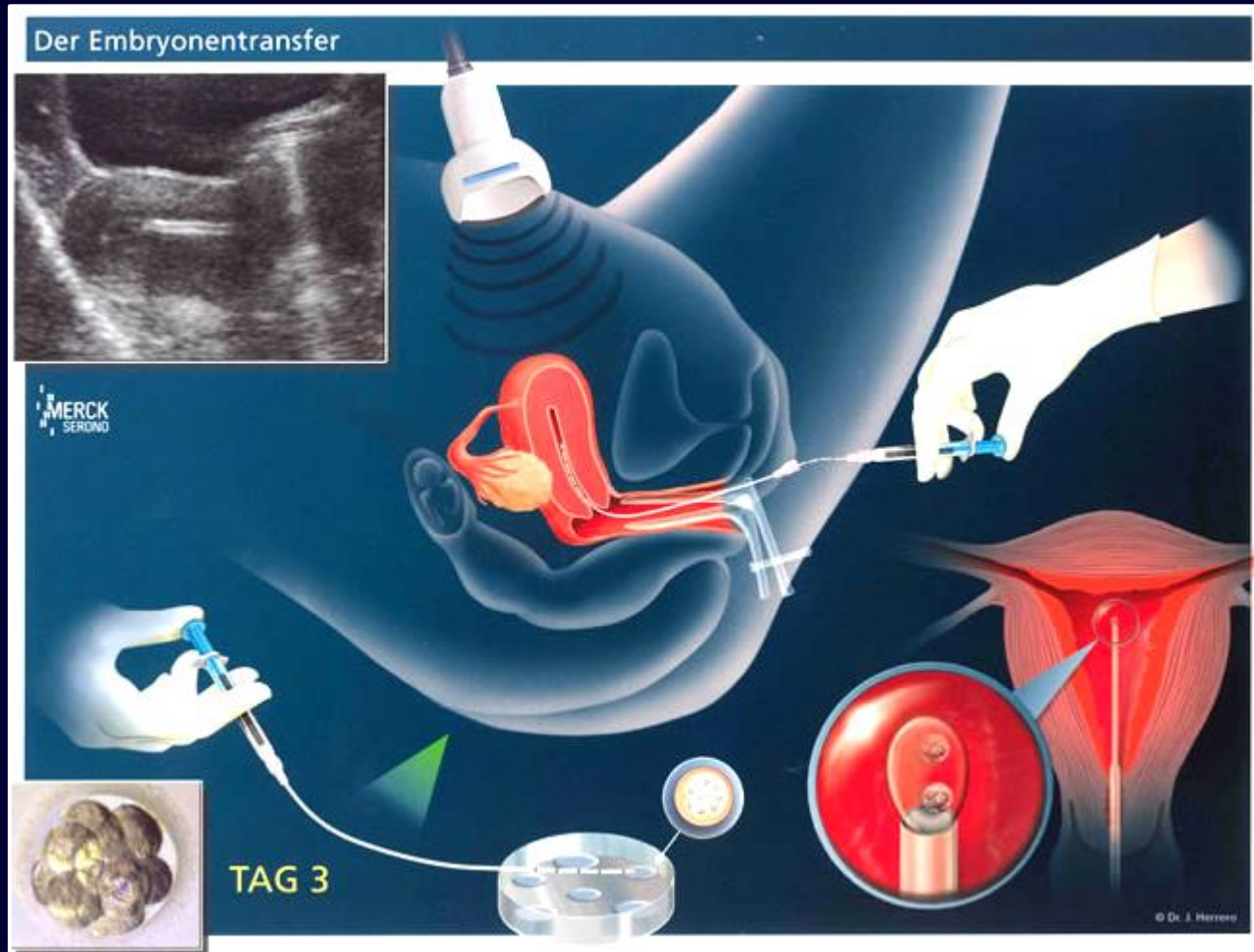
Indikace k ICSI:

- 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)

Preimplantační genetická diagnostika (PGD, PID)

Metody:

- biopsie
(blastomer, blastocysty, polárního tělíska)
- genetické testy
- eliminace embryí se specifickou vadou

PID se provádí obvykle v kombinaci s ICSI



Biopsie pólocytu pro účely PID



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 genetika: dle indikace / diagnózy
 - celogenomová analýza

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



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

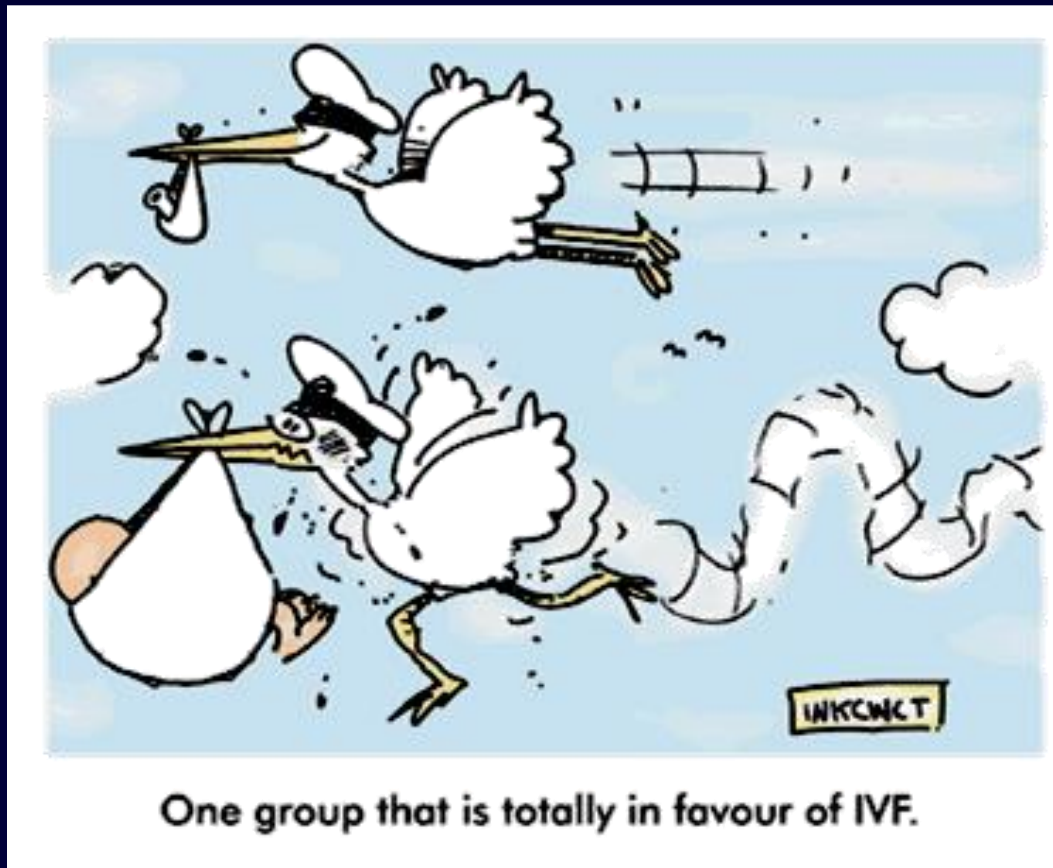
Outcomes of IVF conceptions: are they different?

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



KLONOVÁNÍ ČLOVĚKA

Klonování člověka

Reprodukční klonování (Reproductive Cloning):

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

Terapeutické klonování (Research Cloning):

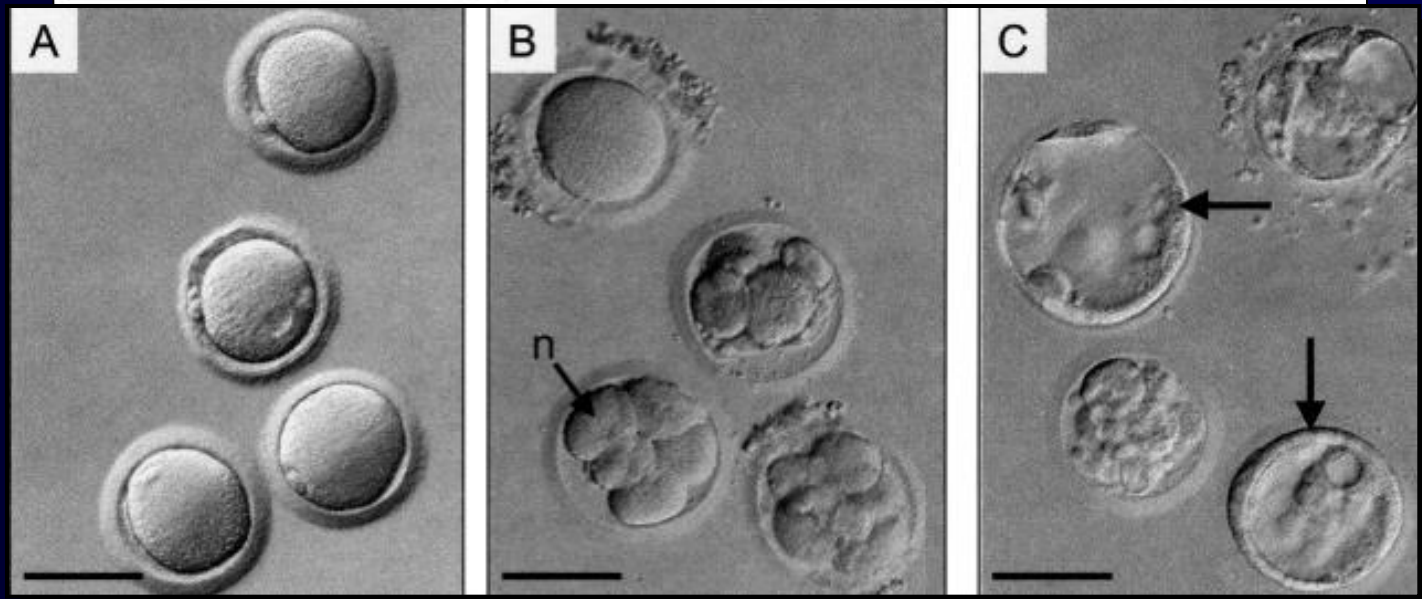
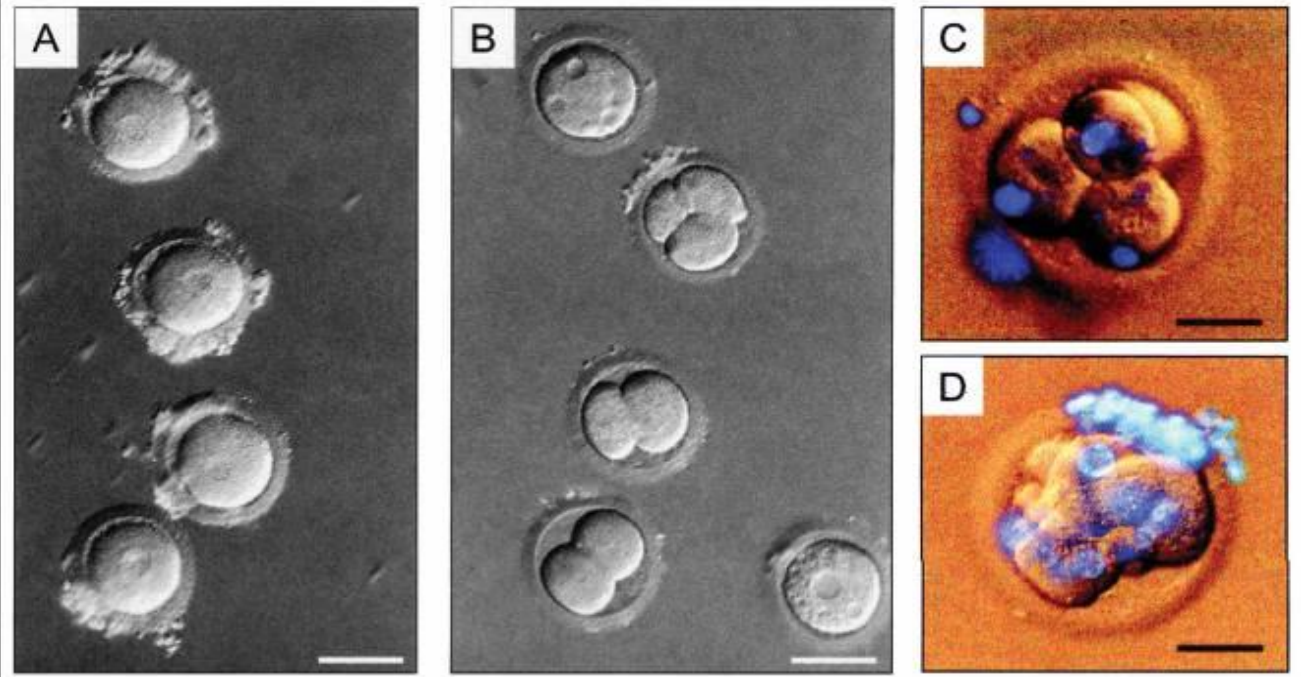
- embryo, vzniklé metodou SCNT, udržováno v podmínkách *in vitro*
- výzkum (genetická kontrola diferenciací)
- izolace ESCs a indukovaná diferenciací (buněčná terapie bez problémů s imunokompatibilitou)

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



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





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^{1*}, Sung Il Roh², Byeong Chun Lee³, Sung Keun Kang³, Dae Kee Kwon³, Sue Kim³, Sun Jong Kim², Sun Woo Park³, Hee Sun Kwon³, Chang Kyu Lee⁴, Jung Bok Lee², Jin Mee Kim², Curie Ahn⁵, Sun Ha Paek⁵, Sang Sik Chang⁶, Jung Jin Koo⁶, Hyun Soo Yoon⁷, Jung Hye Hwang⁷, Youn Young Hwang⁷, Ye Soo Park⁷, Sun Kyung Oh⁵, Hee Sun Kim⁵, Jong Hyuk Park⁸, Shin Yong Moon⁵, Gerald Schatten^{8*}

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

² Medical Research Center, MizMedi Hospital, Seoul, 135-280, Korea.

³ College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

⁴ School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

⁵ College of Medicine, Seoul National University, Seoul, 110-744, Korea.

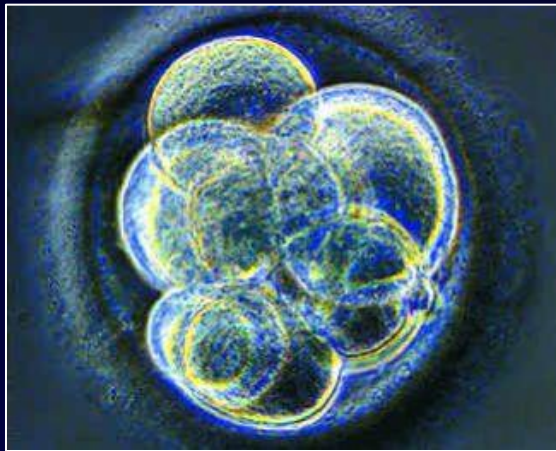
⁶ Hanna Women's Clinic, Seoul, 137-872, Korea.

⁷ School of Medicine, Hanyang University, Seoul, 471-701, Korea.

⁸ 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.







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

??? 2006 - Zavos and Illmense:

- 3 "rekonstruovaná" lidská embrya (SCNT), z toho 1 se vyvíjelo do 4buněčného stádia
- následná implantace do dělohy příjemkyni – gravidita se nepotvrdila

Archives of Andrology, 52:243–254, 2006

Copyright © Taylor & Francis Group, LLC

ISSN: 0148-5016 print/1521-0375 online

DOI: 10.1080/01485010500503637



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

http://www.zavos.org/library/UAAN_A_150346.pdf

POSSIBLE THERAPY OF MALE INFERTILITY BY REPRODUCTIVE CLONING: ONE CLONED HUMAN 4-CELL EMBRYO

P. M. Zavos and K. Illmensee & *Reprogen Ltd., Limassol 3106, Cyprus, and Andrology Institute of America Lexington, Kentucky, USA*



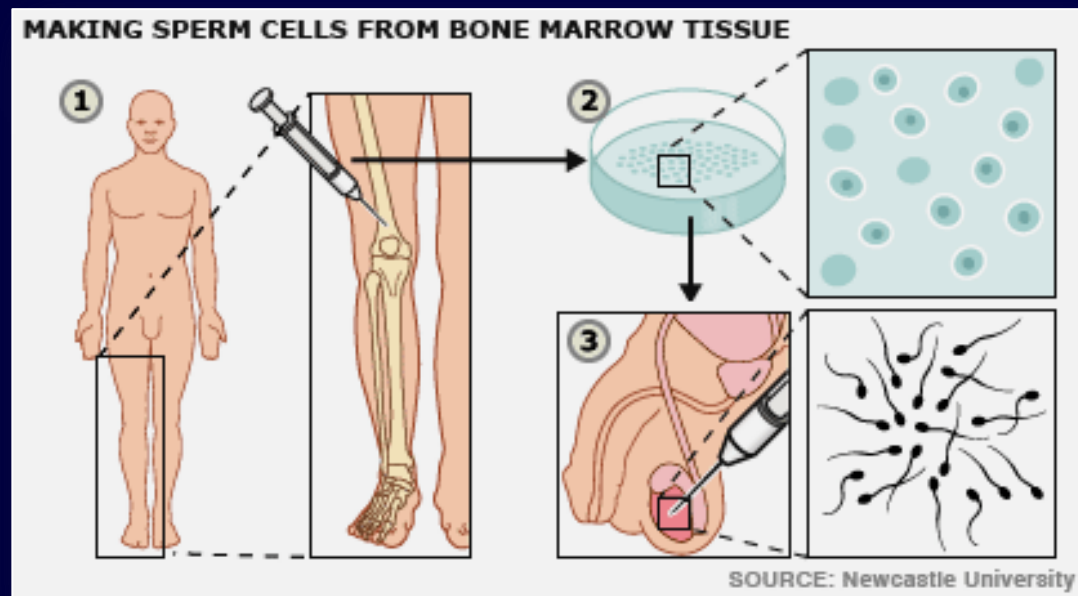
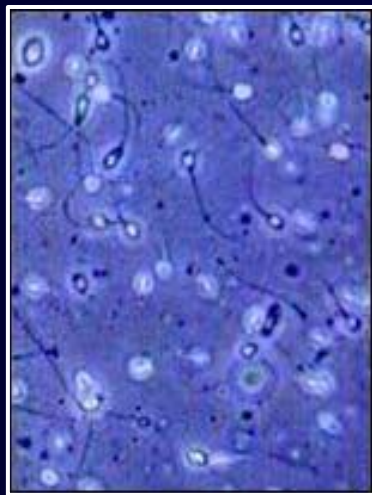


"Holy great mother of God, I've been cloned!"

PŘÍPRAVA UMĚLÝCH GAMET

2007 - Universities of Göttingen and Münster Medical School of Hannover

- "umělá spermie": spermatogonium připravené transdiferenciací buněk kostní dřeně následná diferenciaci do fenotypu spermii
- **neověřeno!**



2009 - Karim Nayernia

- "umělá spermie"
- neplodný muž → jádro somatické buňky → SCNT → blastocysta → odběr hESCs → diferenciacie do fenotypu spermií





Pioneer:
Professor
Karim
Nayernia

HOW THE TECHNIQUE COULD WORK

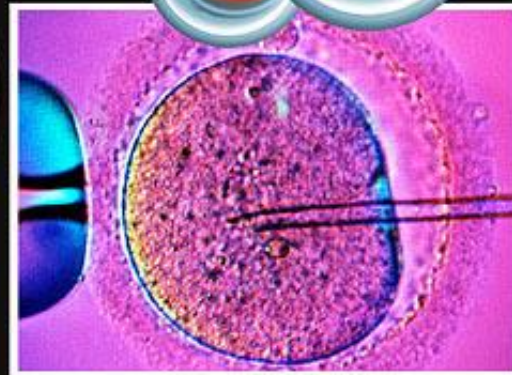
1 Stem cells are taken from female donor's bone marrow.

2 They are then cultivated in a chemical soup that turns them into 'female' sperm cells.



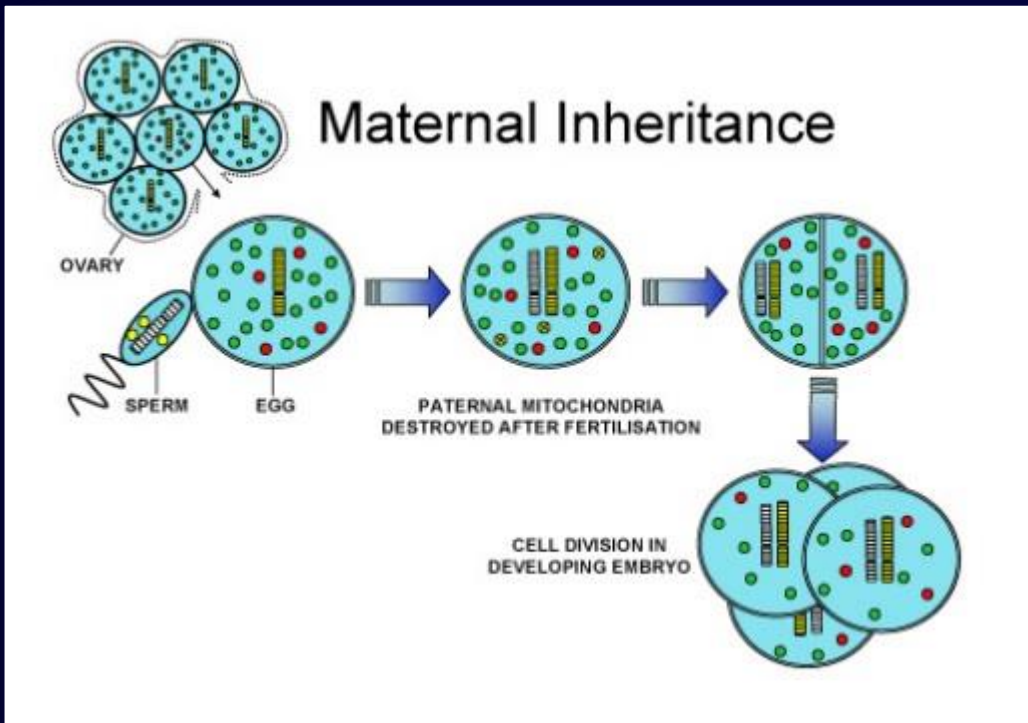
STEM CELLS: Blank cells with the power to turn into other cell types, creating a 'repair kit' for the body.

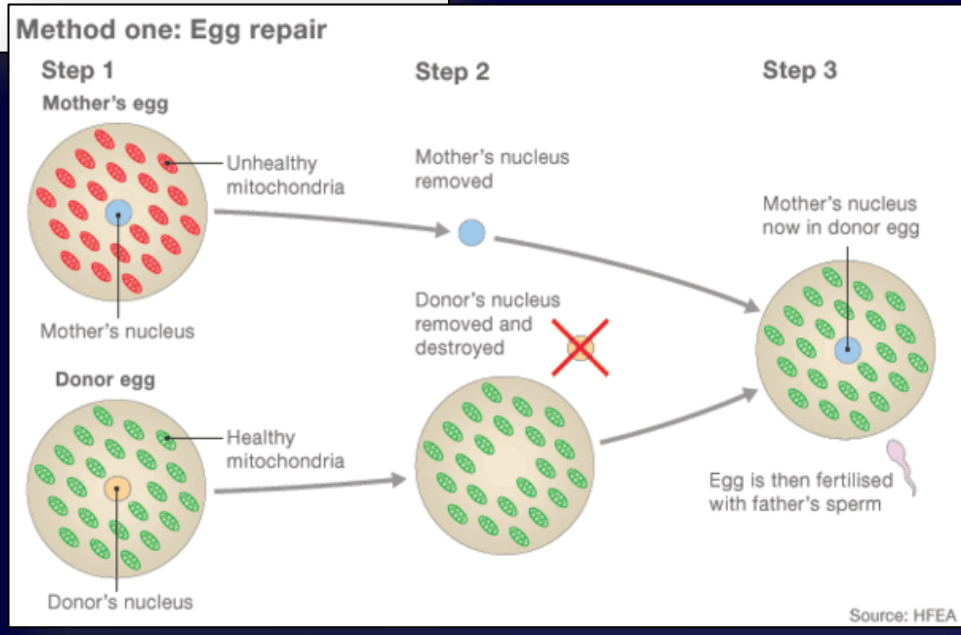
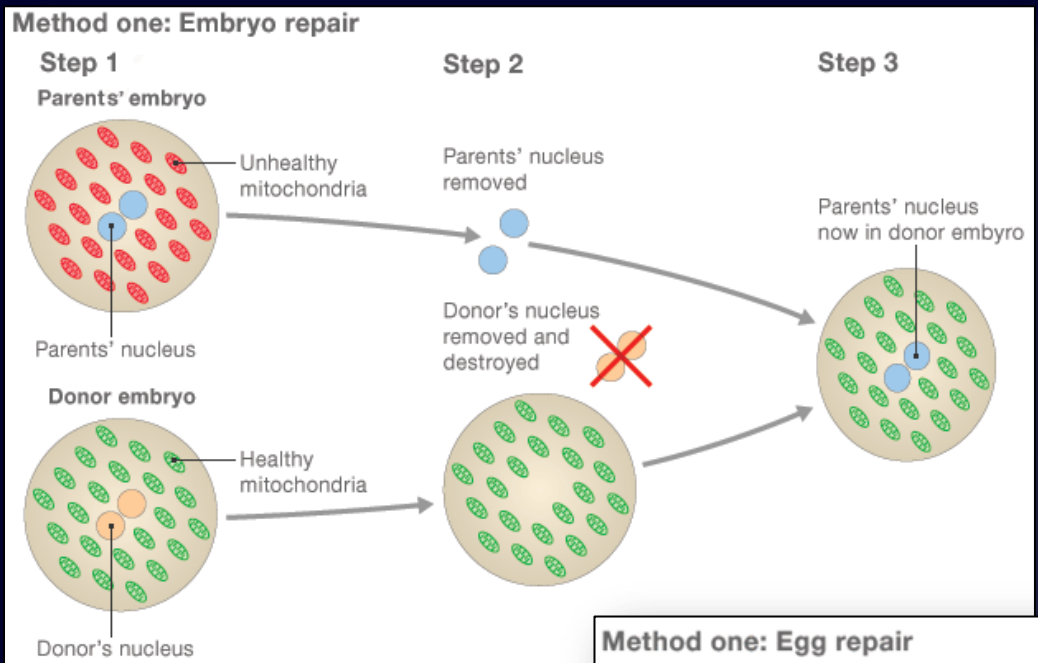
3 The sperm cells could then be used to fertilise eggs using IVF techniques.



2015 – "three parent babies"

- britská vláda schválila návrh umožňující vytváření embryí z DNA 3 lidí





Source: HFEA



