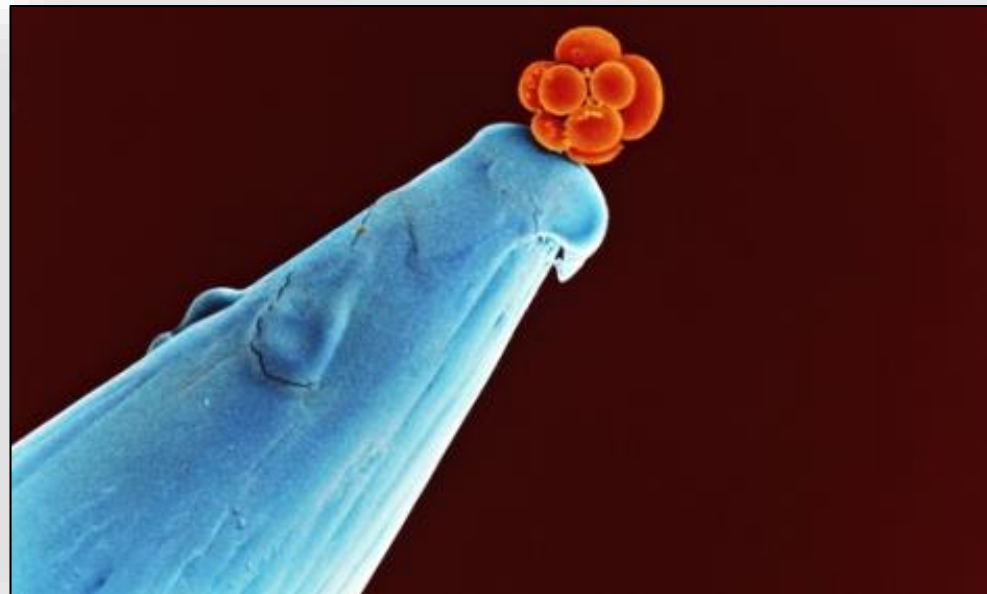


# LÉKAŘSKY ASISTOVANÁ REPRODUKCE



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

## 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

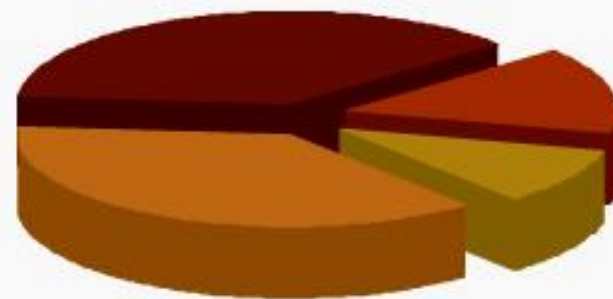
### Pravidelné spontánní potraty / kojenecká úmrtnost

= 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



- Failure of ovulation (15% of cases)
- Pelvic disease : tubal damage or endometriosis (30 to 40% of cases)
- Male factor with an abnormal semen analysis (30 to 40% of cases)
- Unexplained infertility in 10% of cases

- 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

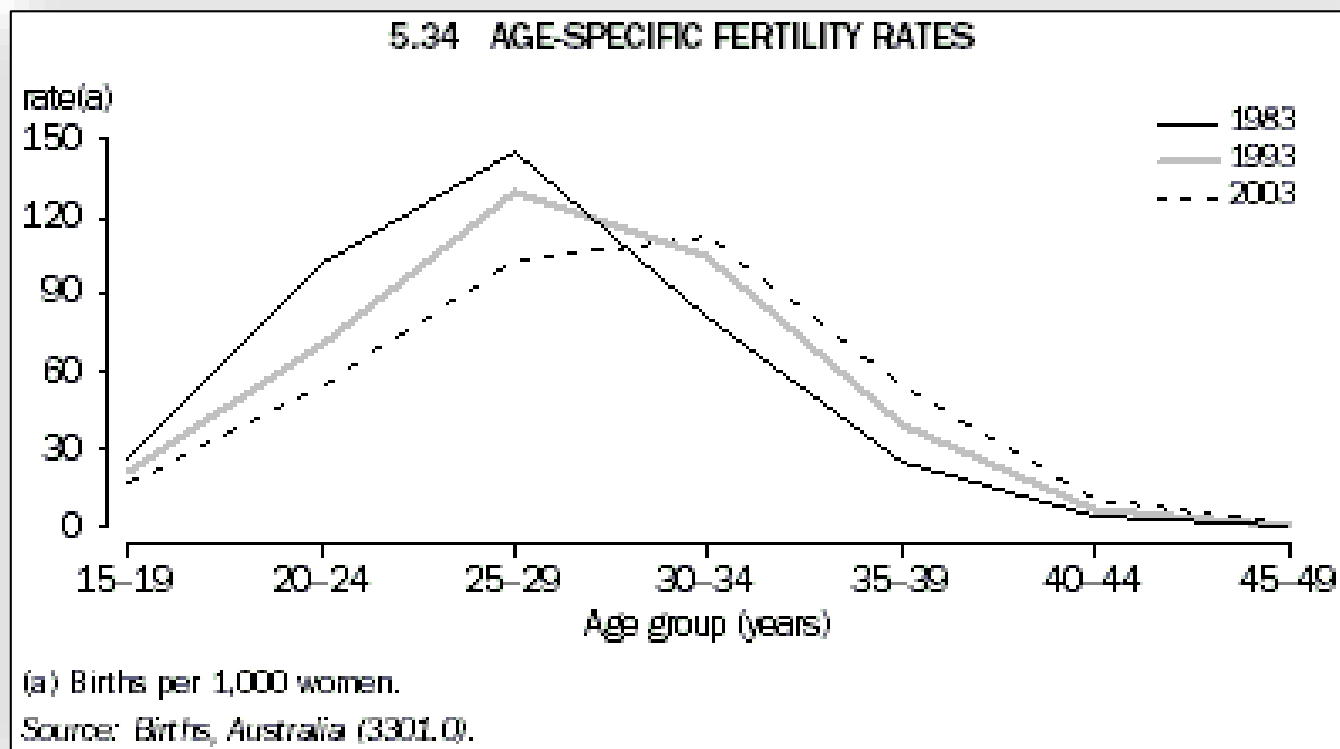
- **mužská neplodnost**

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

- **další příčiny neplodnosti**

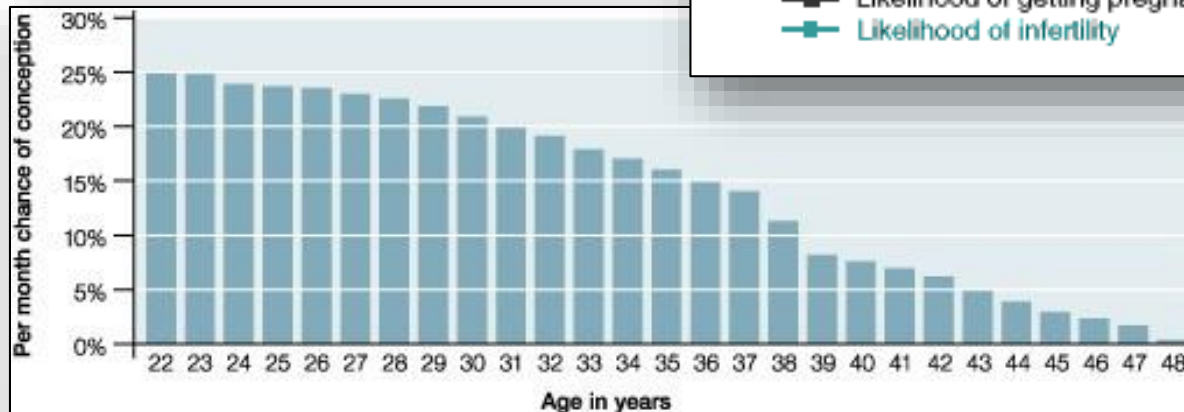
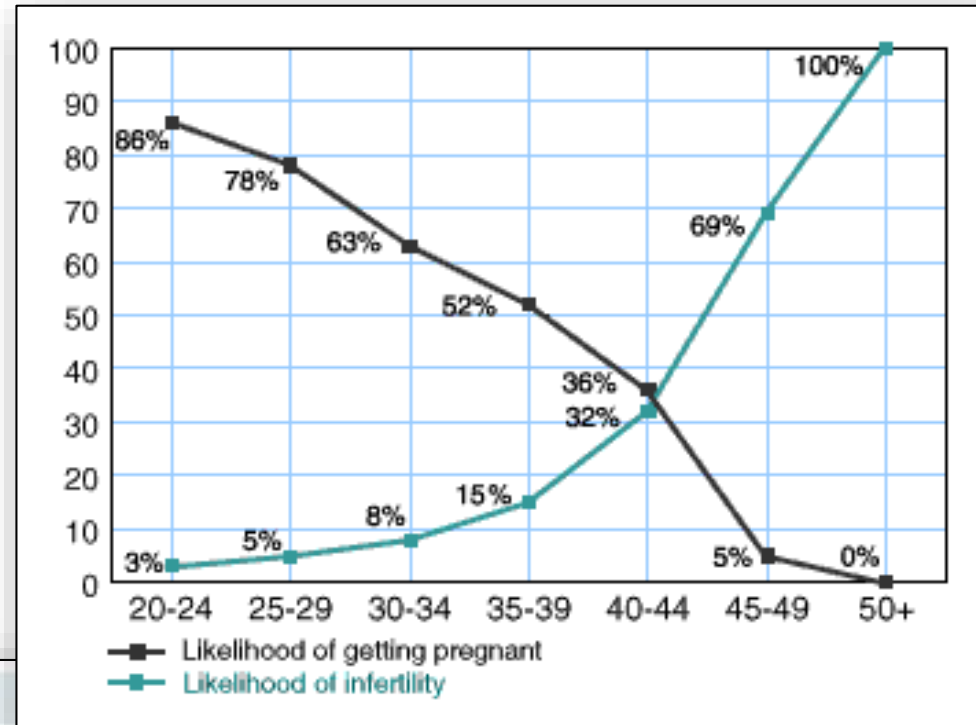
vyšší věk při početí, stres, užívání drog a léků, kuřáctví, alkoholismus, vliv životního prostředí

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





Pravděpodobnost  
početí a neplodnosti  
u žen dle věkových  
kategorií:



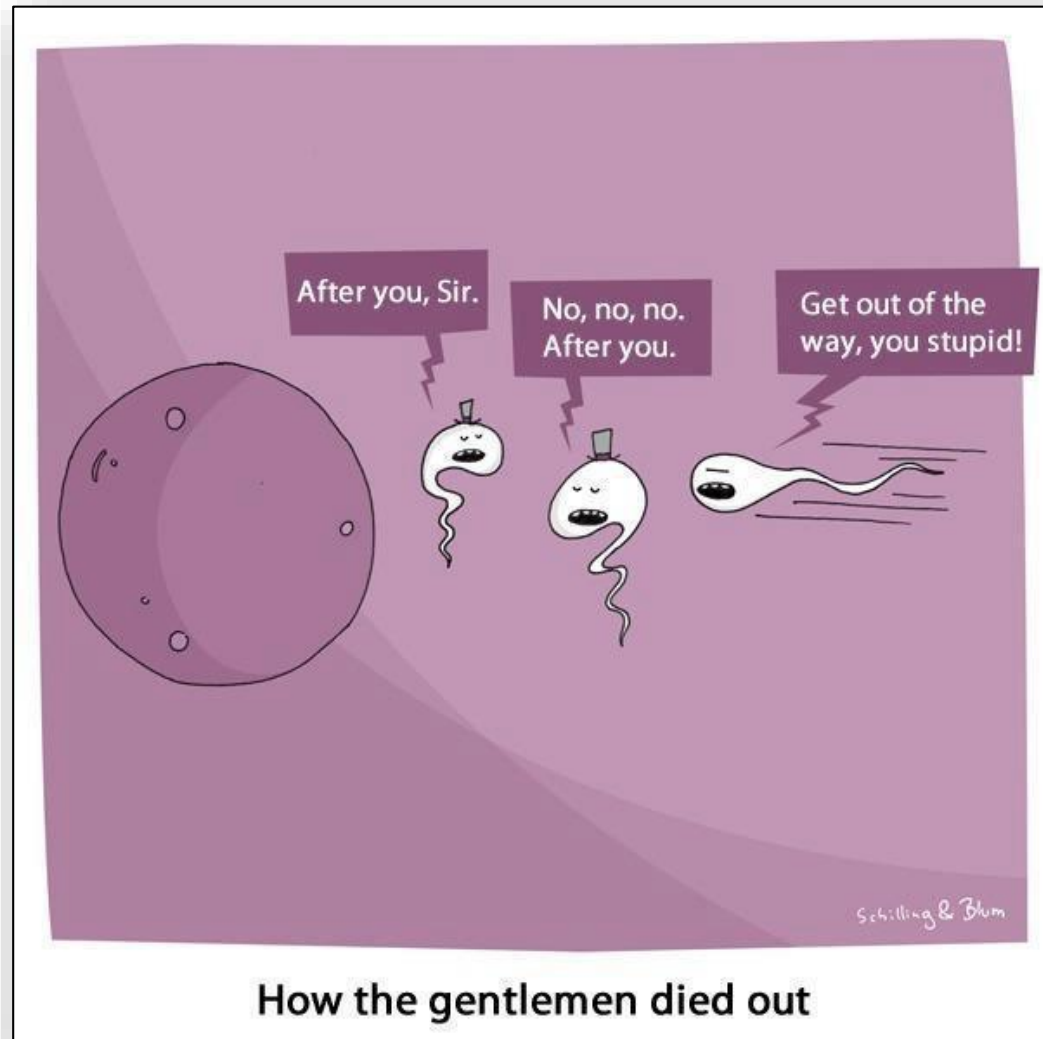
## Základní vyšetření při neplodnosti

- základní gynekologické vyšetření

rodinná, osobní a gynekologická anamnéza, křivka bazálních teplot, mikroabraxe endometria, mikrobiální obraz poševní, onkologická cytologie, kolposkopie, případně rentgenové vyšetření dělohy

- specializované vyšetření

laboratorní hormonální screening, vaginální ultrazvuk, vyšetření spermogramu, případně komplexní diagnostická laparoskopie a hysteroskopie, genetické, imunologické či urologické vyšetření



# LÉKAŘSKY ASISTOVANÁ REPRODUKCE



## ASISTOVANÁ REPRODUKCE

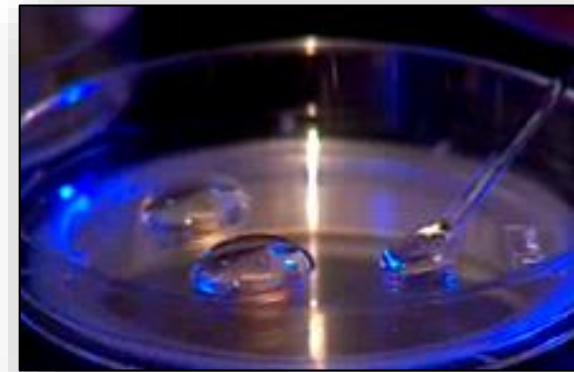
= jakýkoli medicínský zásah, který napomáhá lidskému rozmnožování

- 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:**

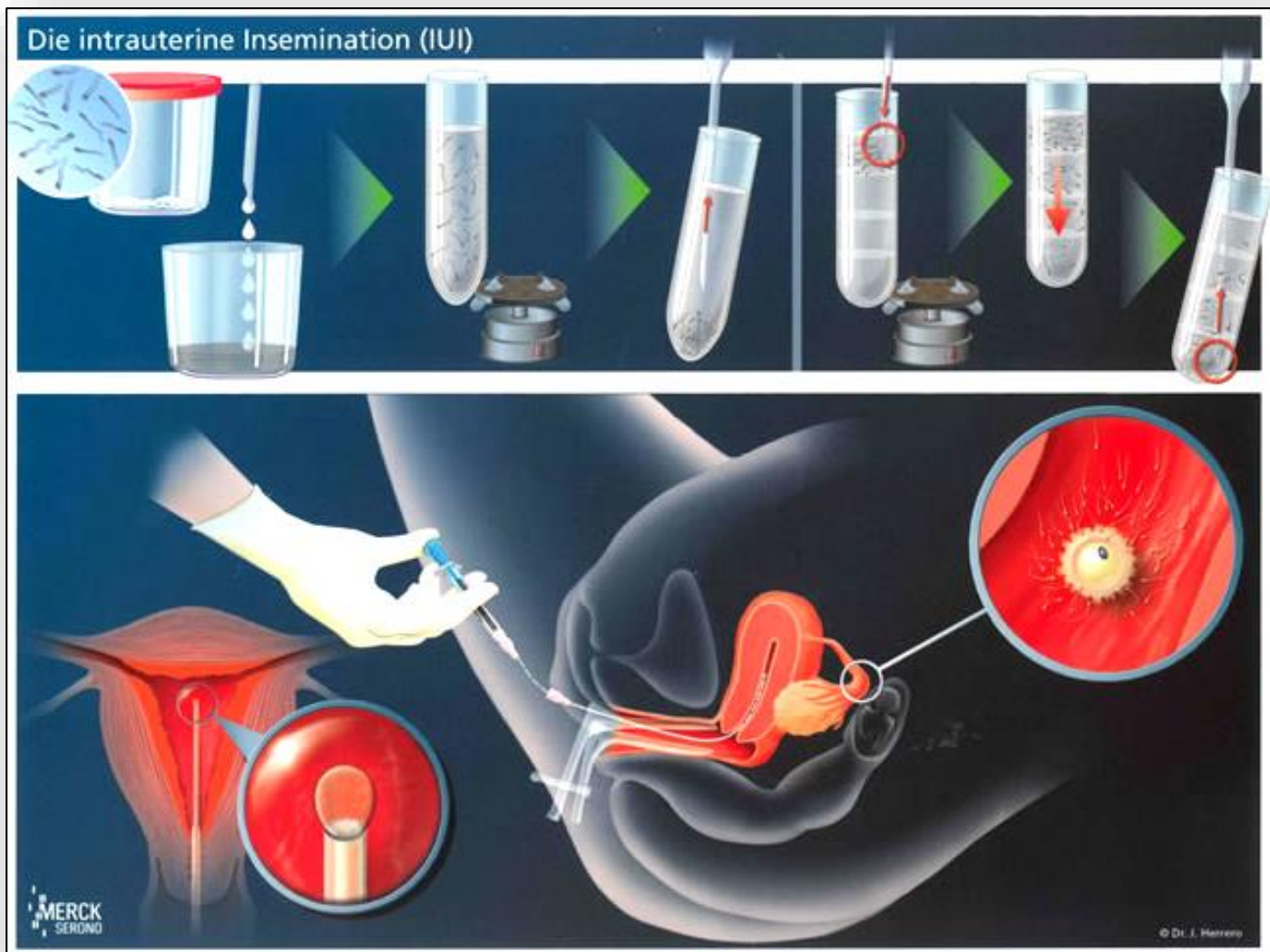
- **umělé oplodnění** (artificial insemination, AI)  
IUI, GIFT
- **oplodnění ve zkumavce** (in vitro fertilization, IVF)  
IVF-ET , IVF-KET , ZIFT  
AH  
MESA , TESE  
PZD, SUZI  
ICSI / PICSI, ROSNI



## AR homologní, heterologní

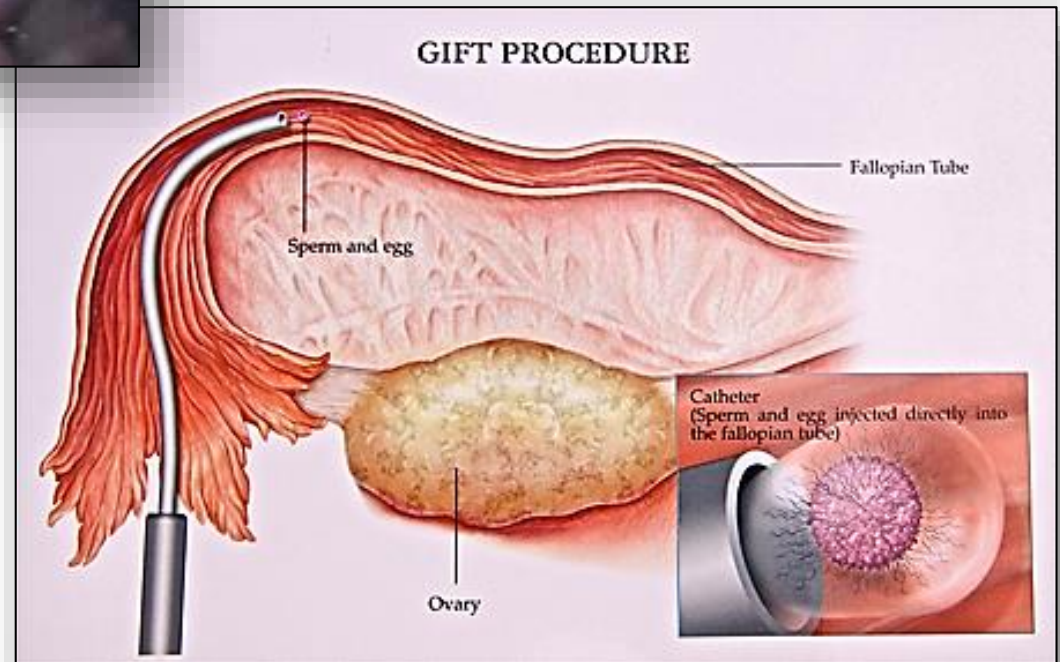
- umělé oplodnění (AI)
  - ✓ intrauterinní inseminace (IUI)
  - ✓ intrafalopiánní transfer gamet (GIFT)
- in vitro fertilizace (IVF)
  - ✓ chirurgický odběr spermií z nadvarlete (MESA) nebo varlete (TESE)
  - ✓ subzonální inzerce spermií (SUZI)
  - ✓ parciální disekce zony pellucidy (PZD)
  - ✓ injekce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

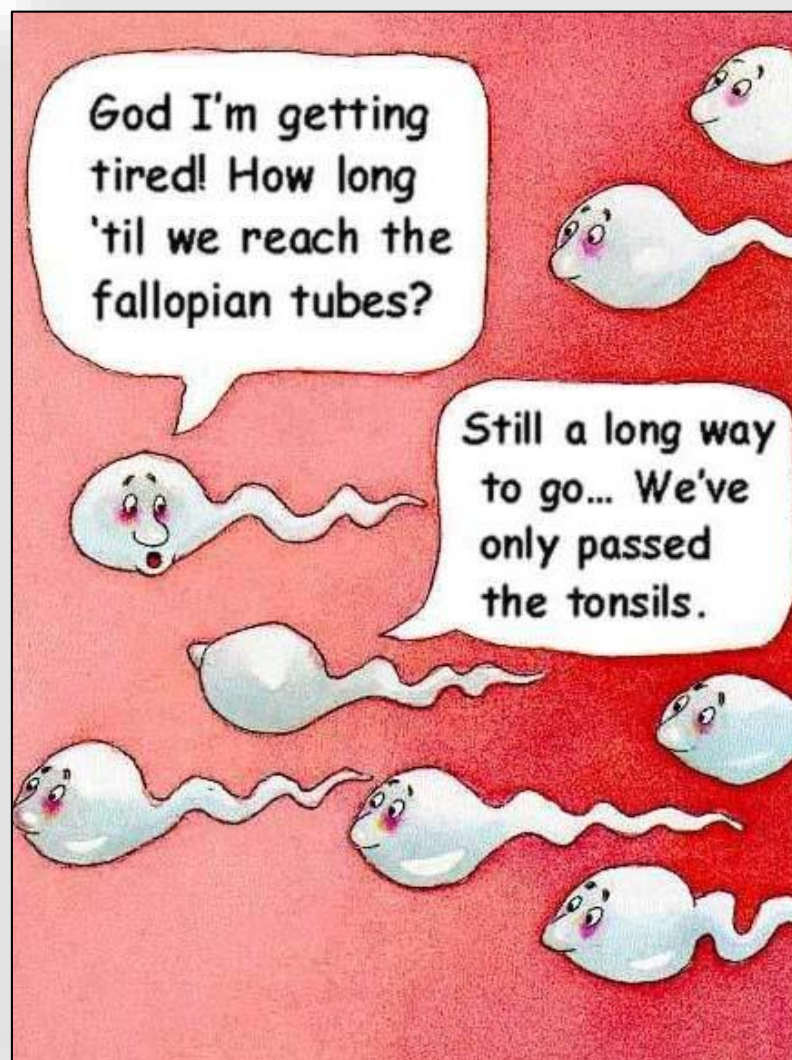
# Intrauterinní inseminace (IUI)





# 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 známý 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:

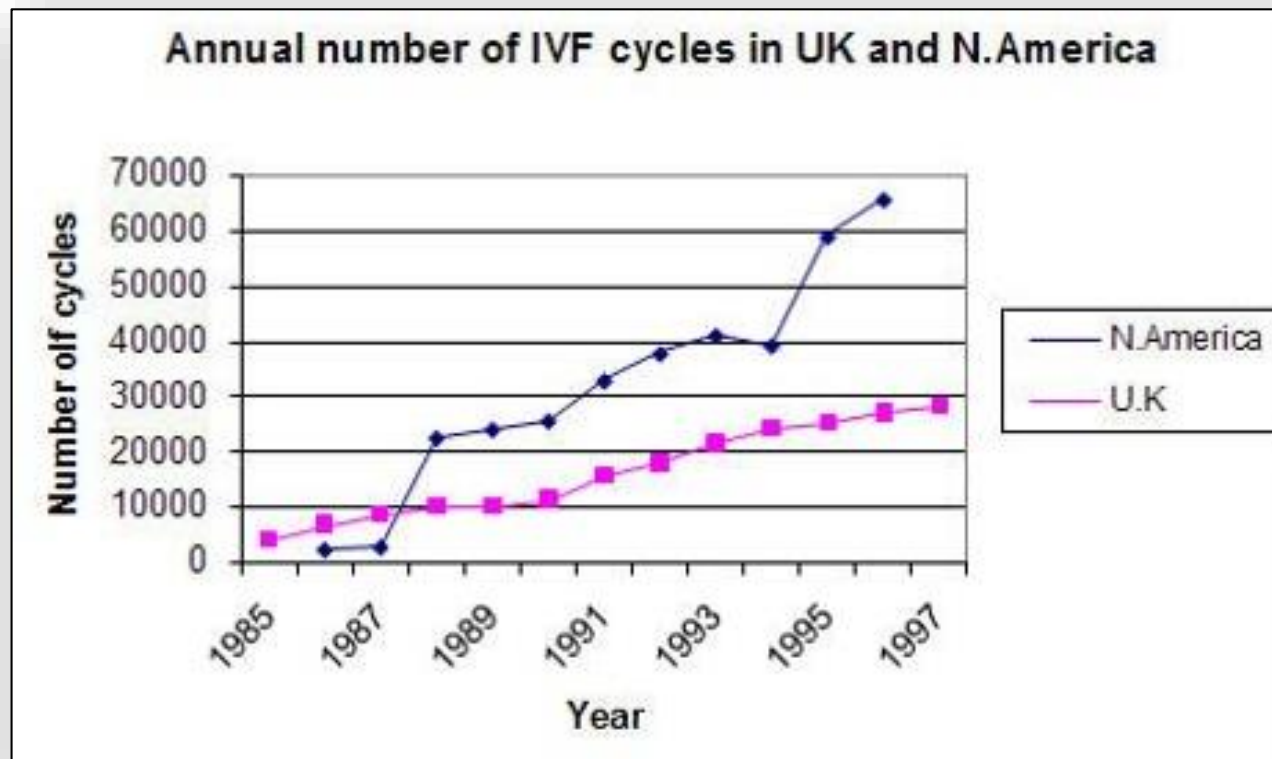
- **Sir Robert G. Edwards**

"for the development of *in vitro* fertilization"

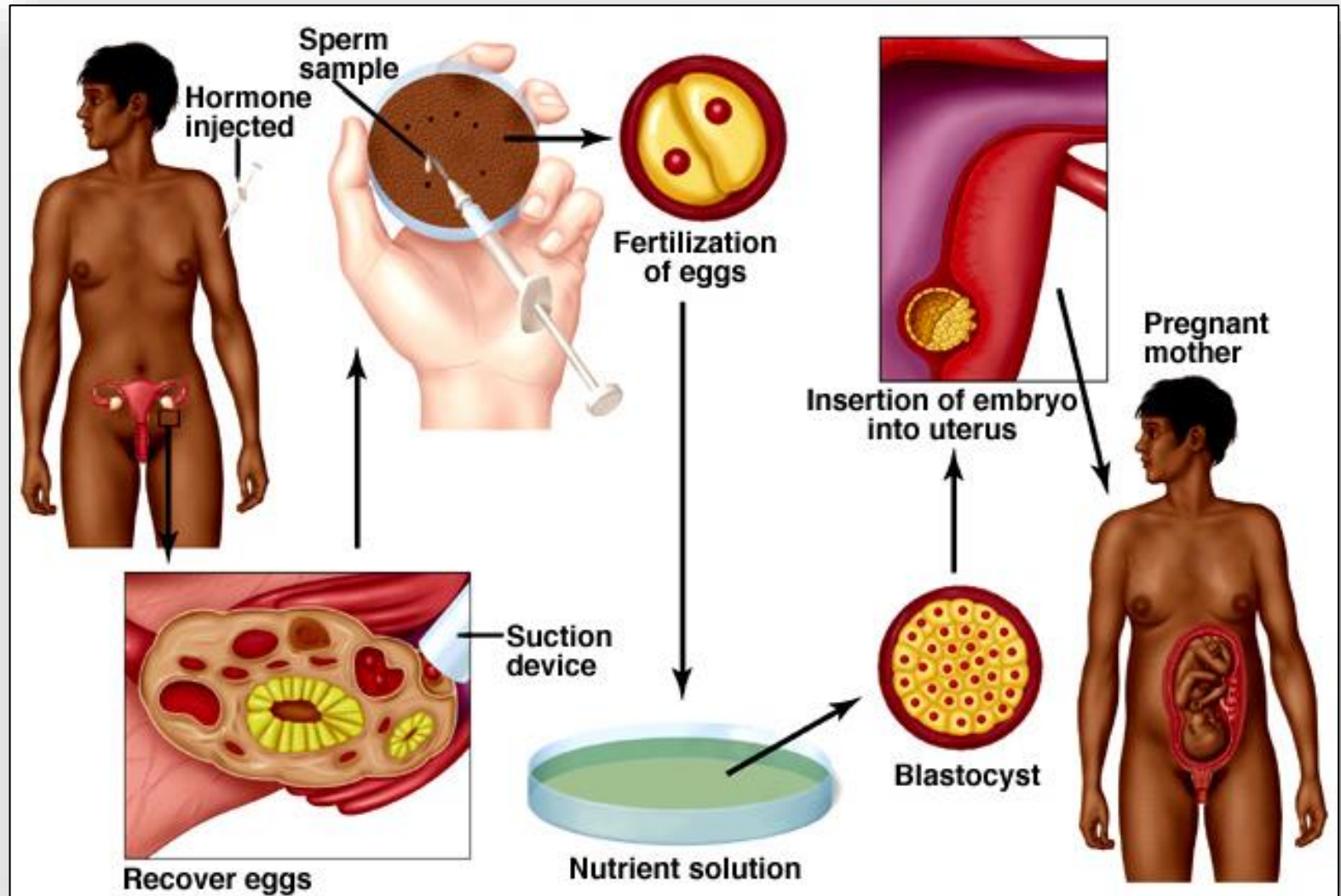




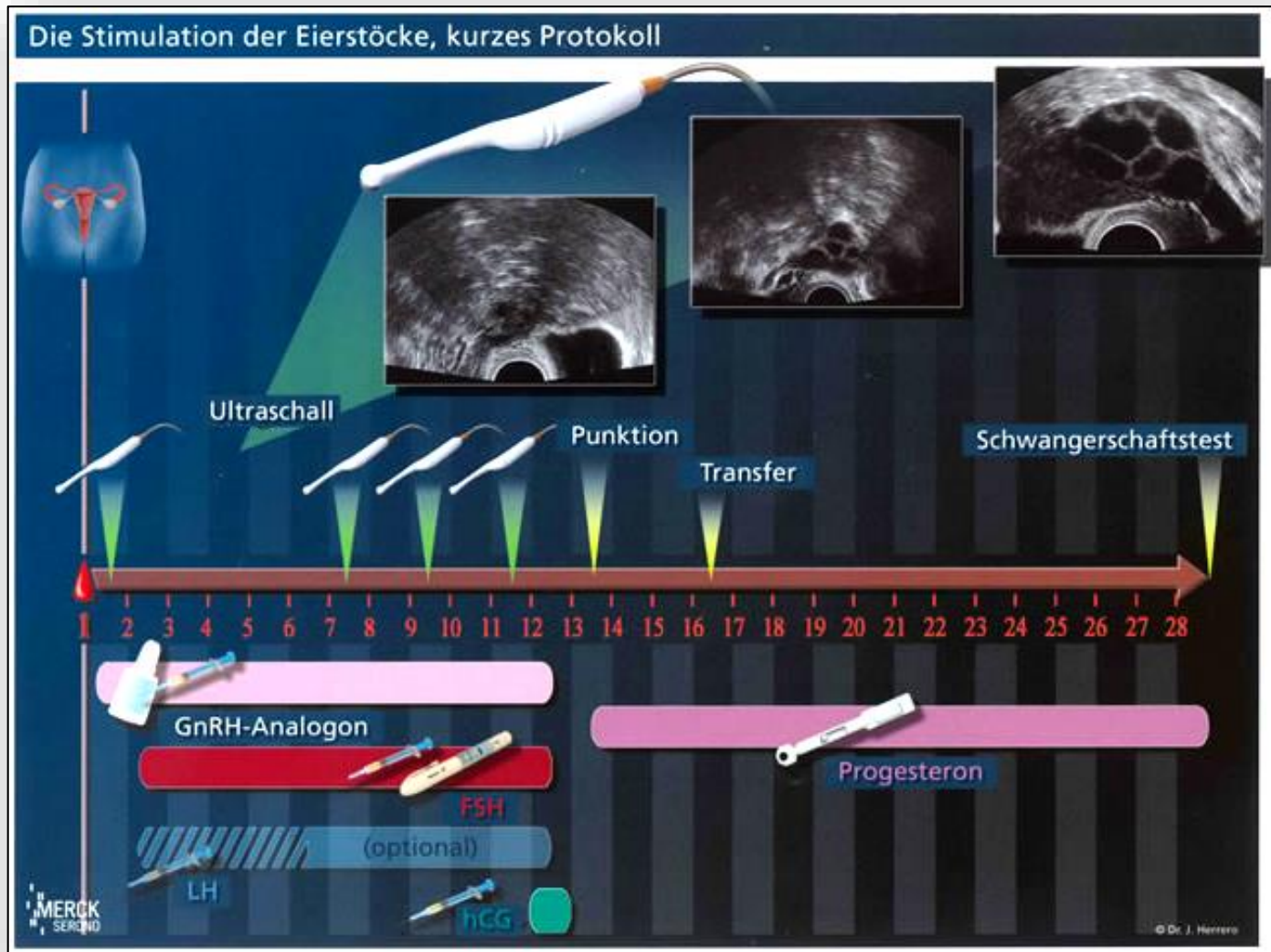
## Nárůst výkonů IVF v letech 1985-1997:



# Základní schéma IVF

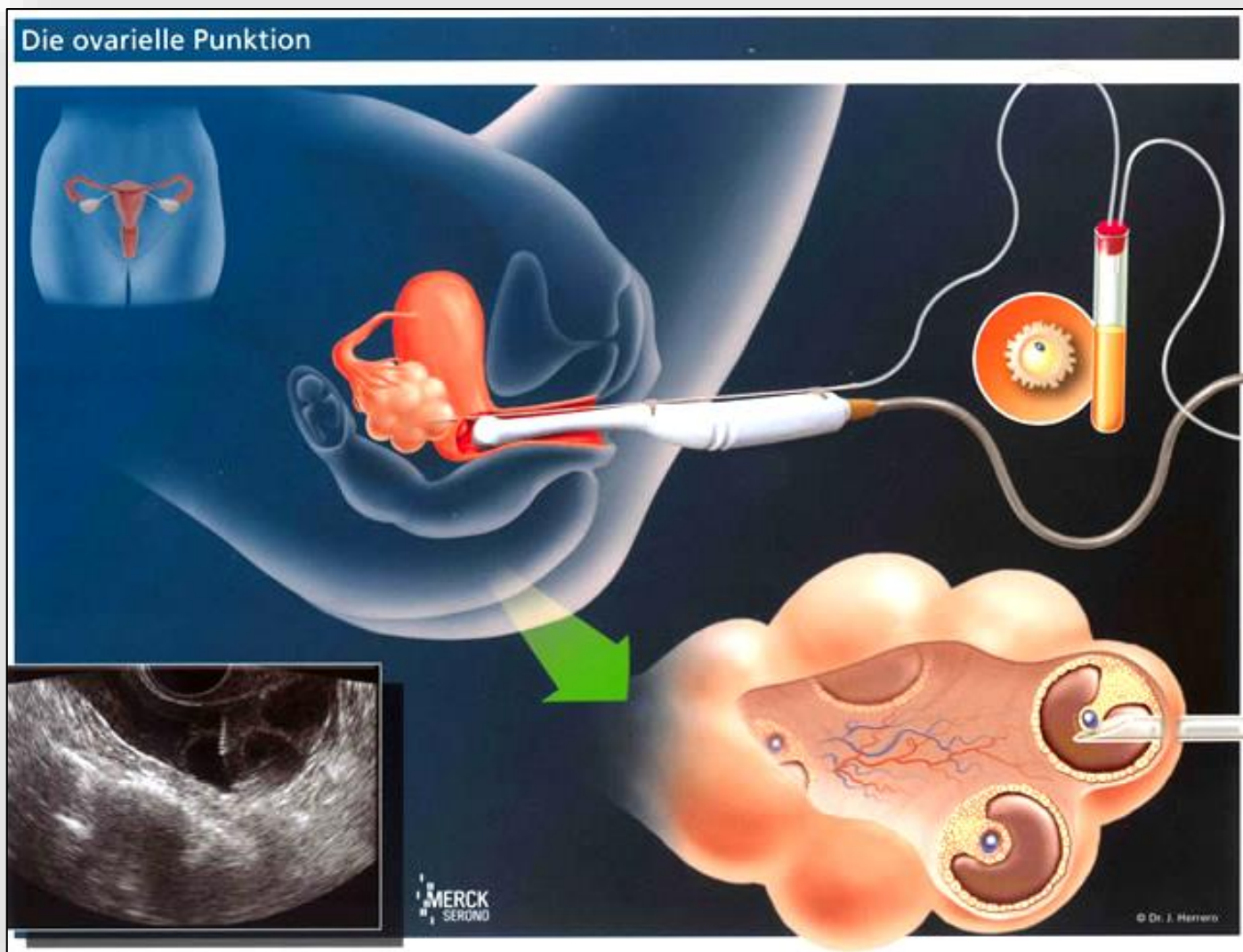


# Příklad protokolu hormonální stimulace

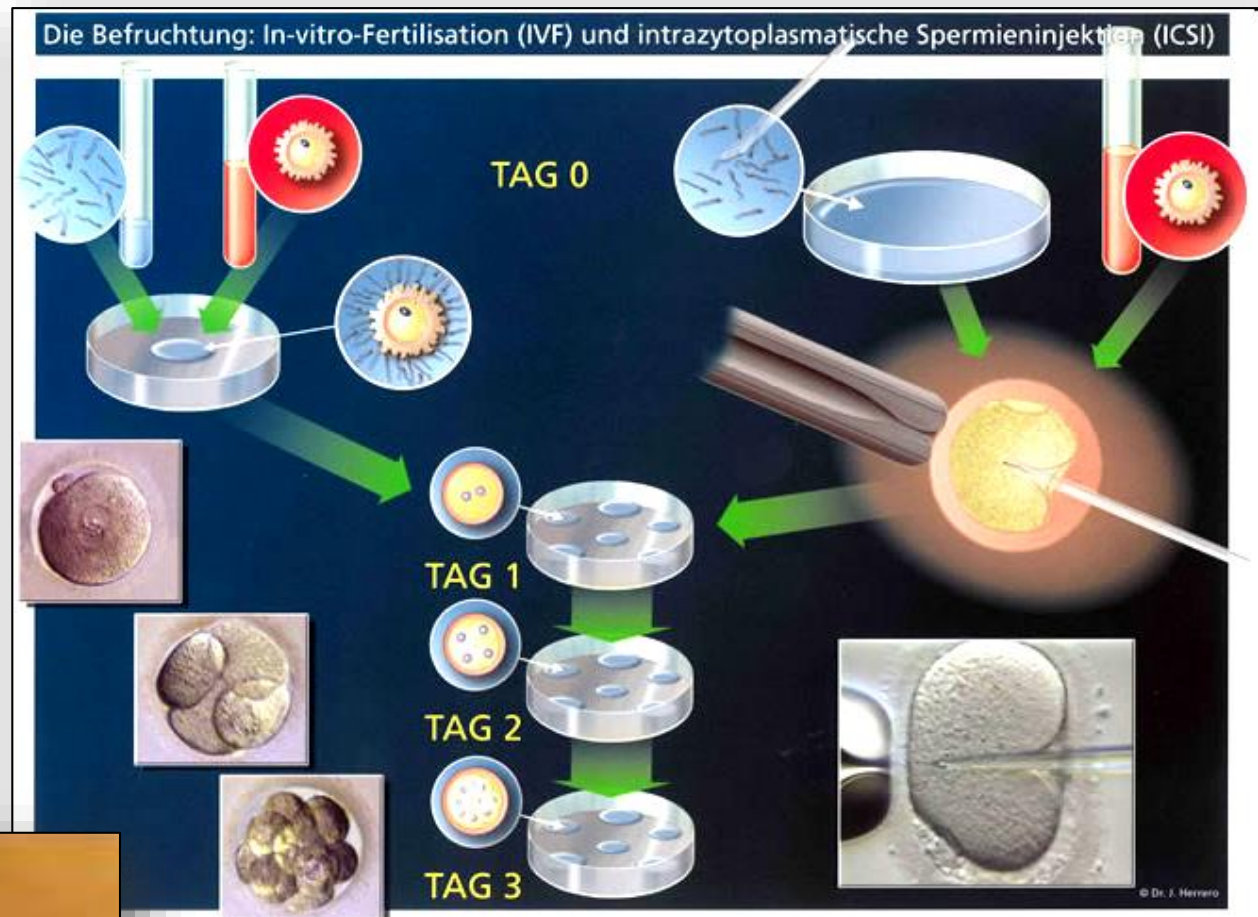




# Odběr oocytů po hyperovulaci



# IVF / ICSI ET

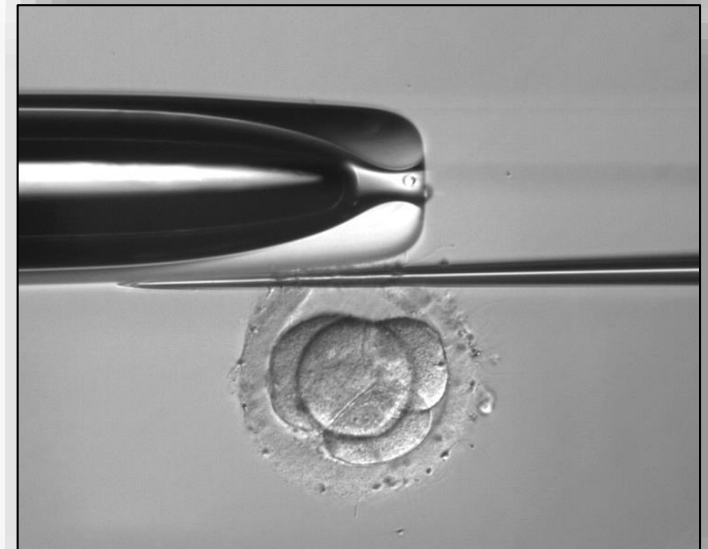
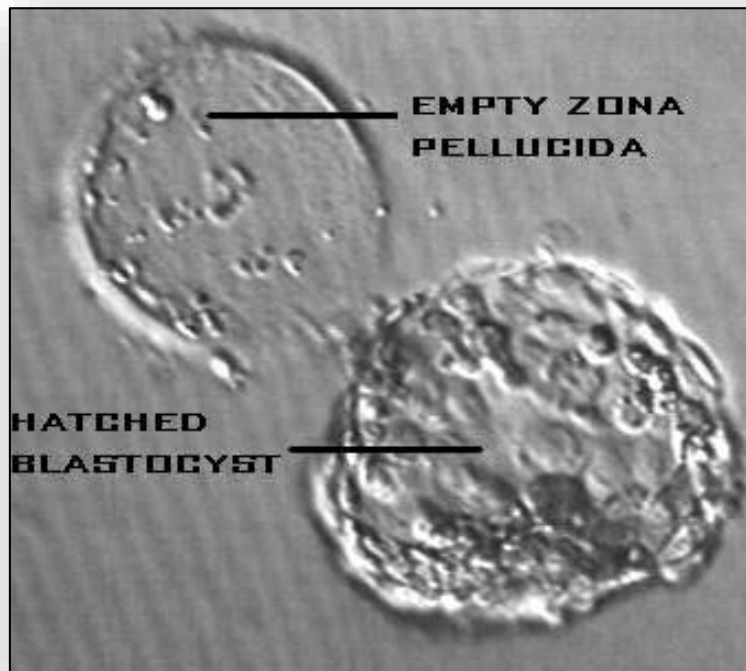


Prodloužená kultivace embryí  
(5 dní)

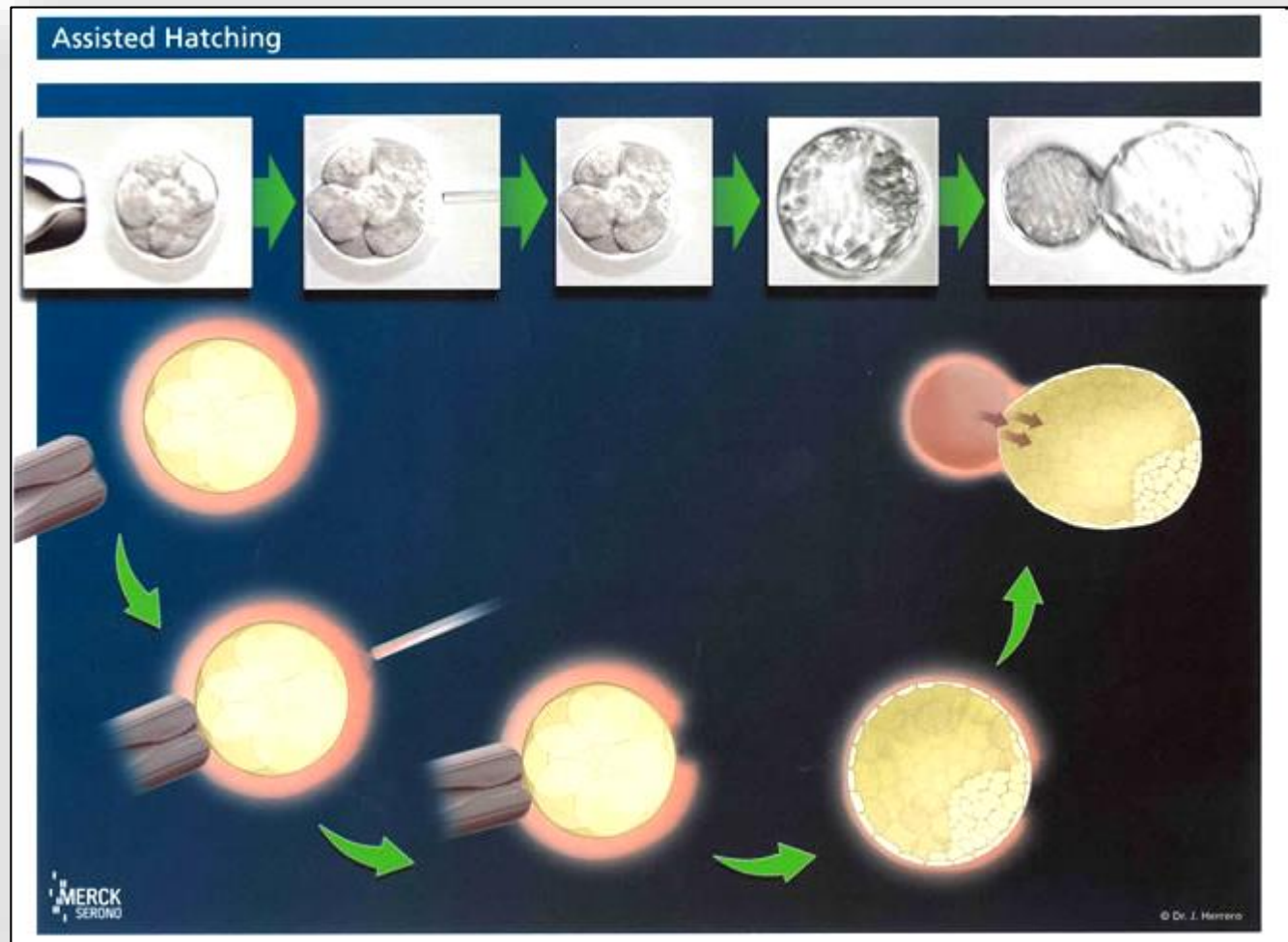


## Asistovaný hatching (AH)

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



## Asistovaný hatching (AH)

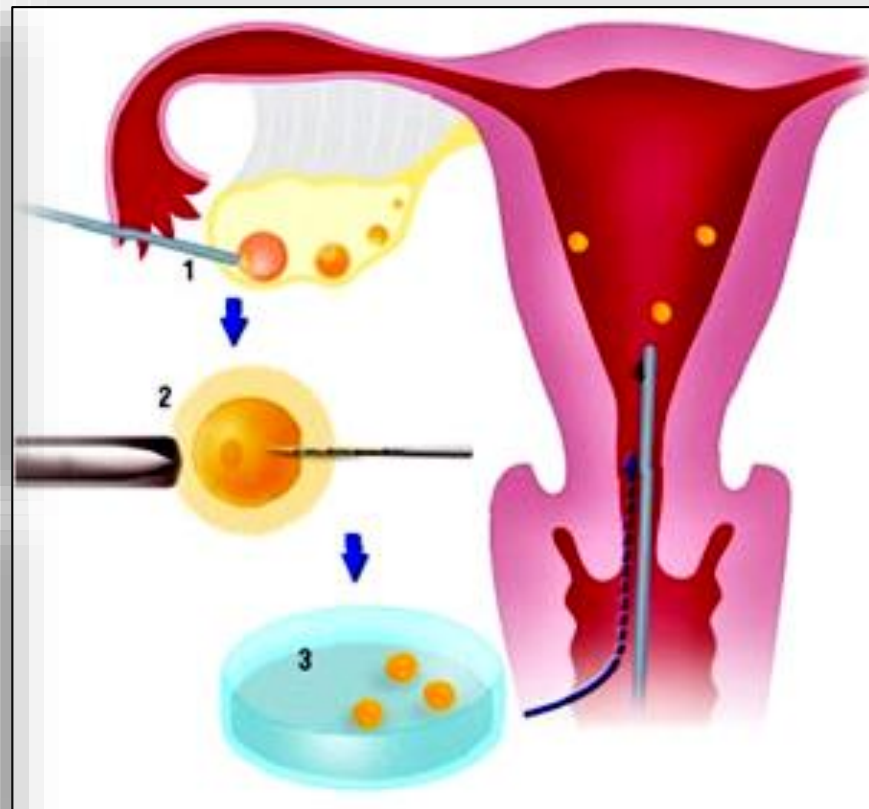


## Indikace k AH:

- 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)



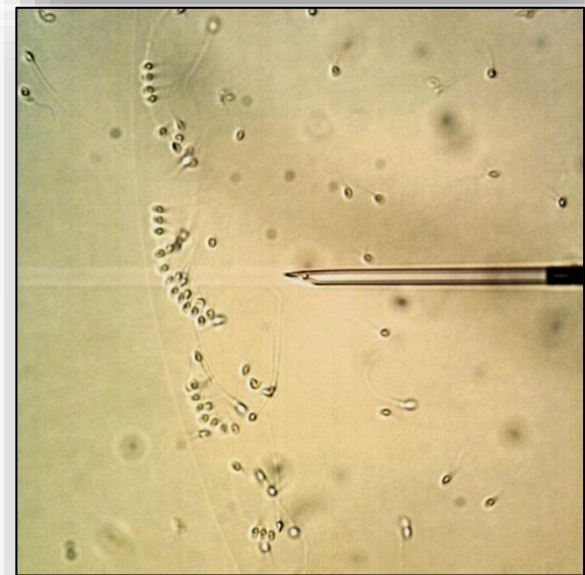
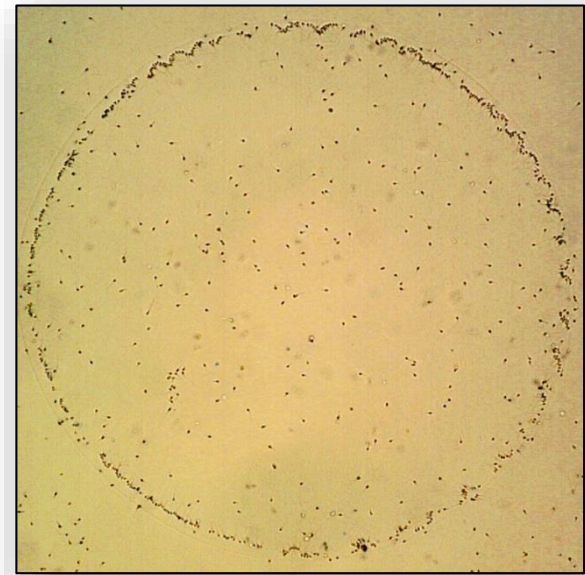
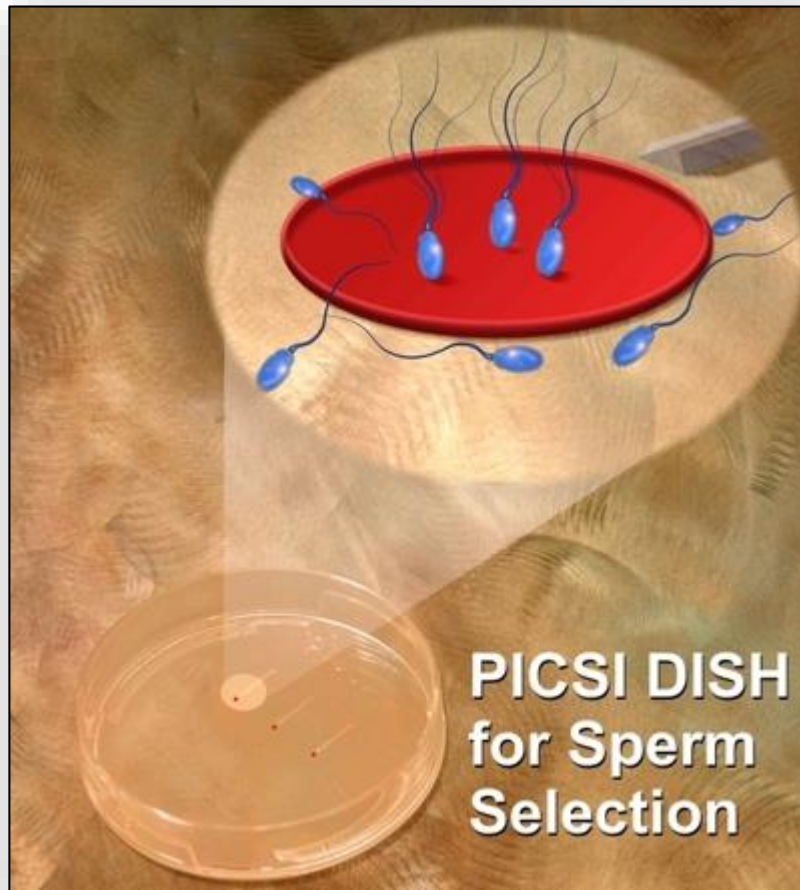


## Indikace k ICSI:

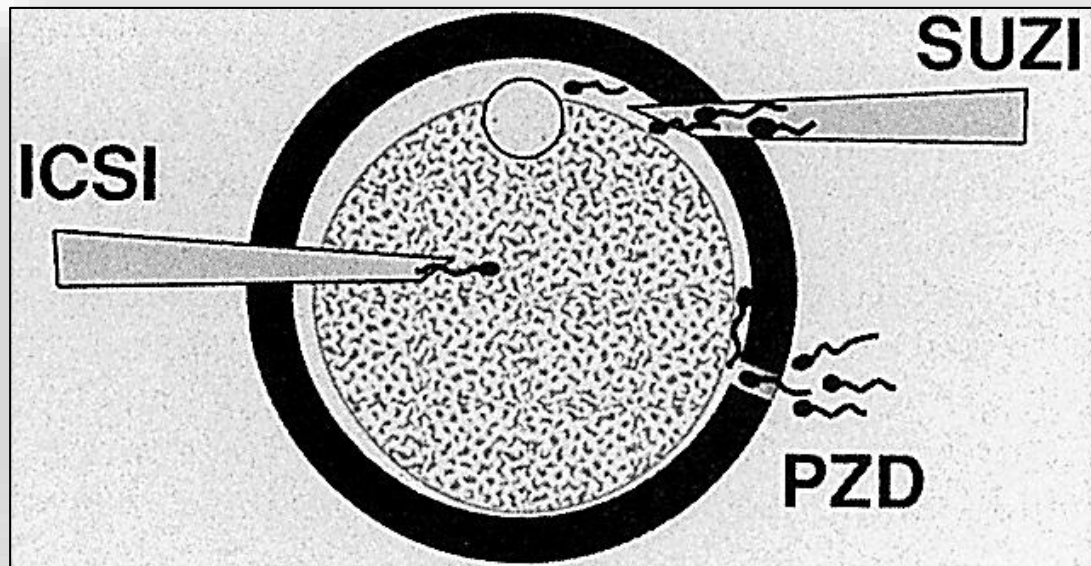
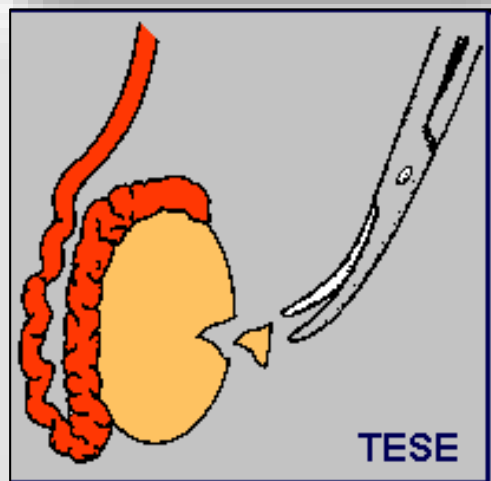
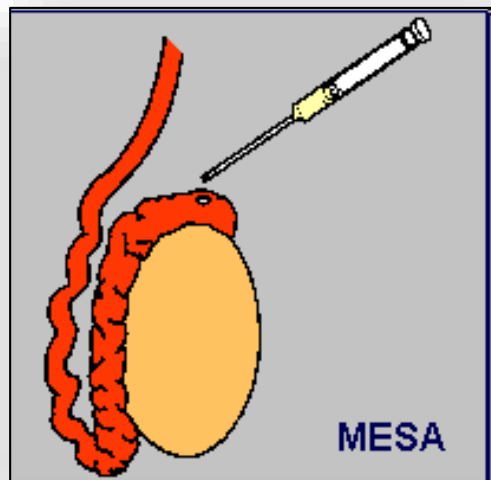
- selhání oplození vajíček v předchozích cyklech
- nízká koncentrace a pohyblivost spermií
- získání spermií chirurgickým odběrem z varlete nebo nadvarlete (= MESA/TESE)
- potřeba provedení preimplantační genetické diagnostiky (PGD)
- na žádost pacientky

## PICSI

- aplikace metody ICSI se zralými spermiemi, které byly selektovány pomocí vazby na hyaluronany



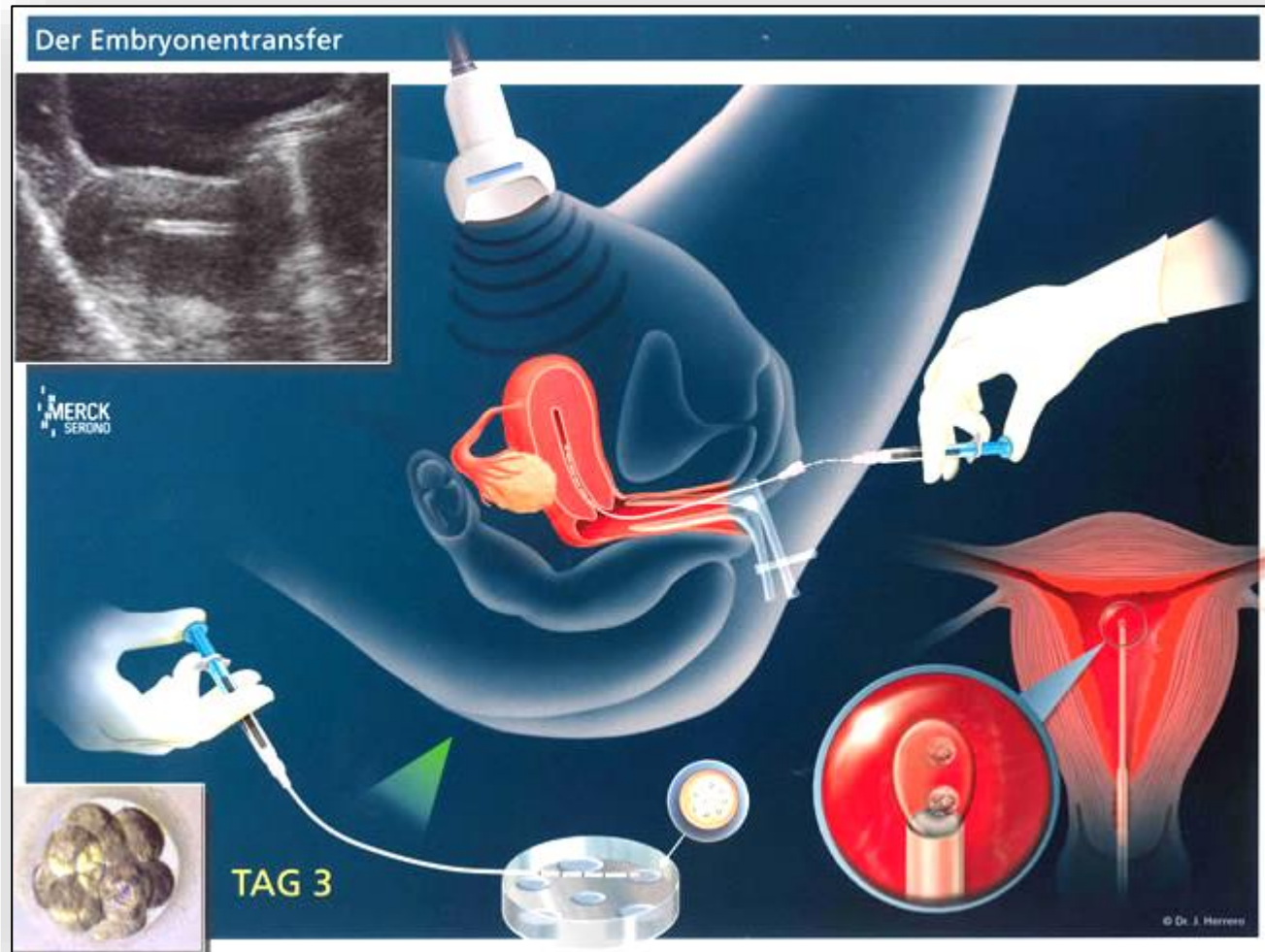
## Metody pro léčbu poruch pohyblivosti spermií



mikromanipulační metody



## Transfer embryí = ET (příp. KET)





## Preimplantační / pregestační genetická diagnostika (PID / PGD)

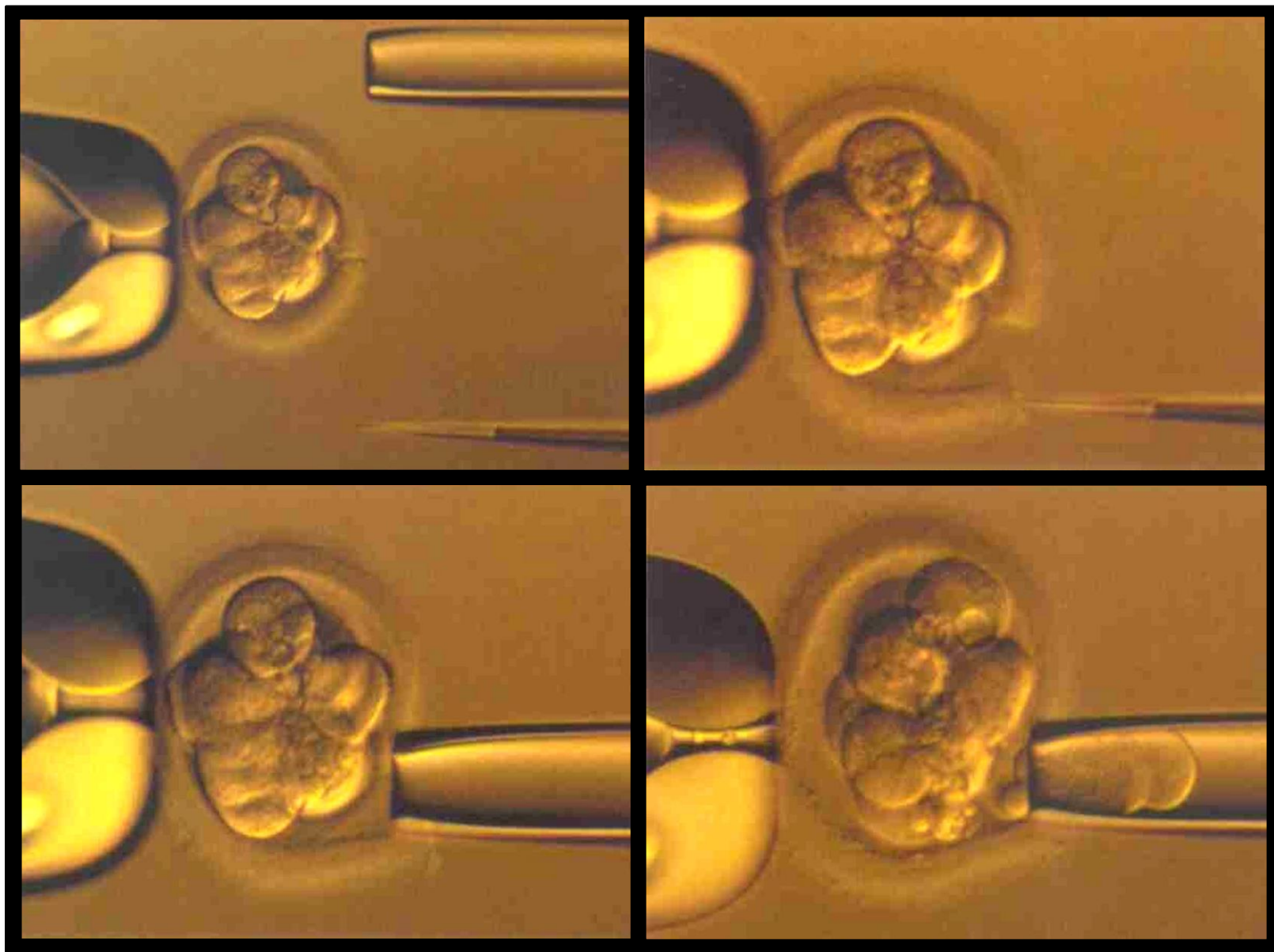
### Metody:

- **biopsie**  
(blastomer, blastocysty, polárního tělíška)
- **genetické testy**
- **eliminace embryí** se specifikovanou vadou

PID se provádí obvykle v kombinaci s ICSI

## Biopsie pólocyту pro účely PID





## Indikace k PID:

- vrožená chromozomální aberace u některého z rodičů
- vyšší věk ženy, nebo obou rodičů
- porod dítěte s vroženou vývojovou vadou v rodině
- opakované spontánní potraty nejasné etiologie
- opakovaná zástava vývoje embryí na prodloužené kultivaci

## Historický vývoj detekčních metod:

- cytogenetika (FISH): 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 ???



ELSEVIER

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.



ELSEVIER

Best Practice &amp; 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>**BEST**  
PRACTICE  
& RESEARCH**5**  

---

## **Outcomes of IVF conceptions: are they different?**

Jane Halliday\* BSc(Hons), PhD

Associate Professor

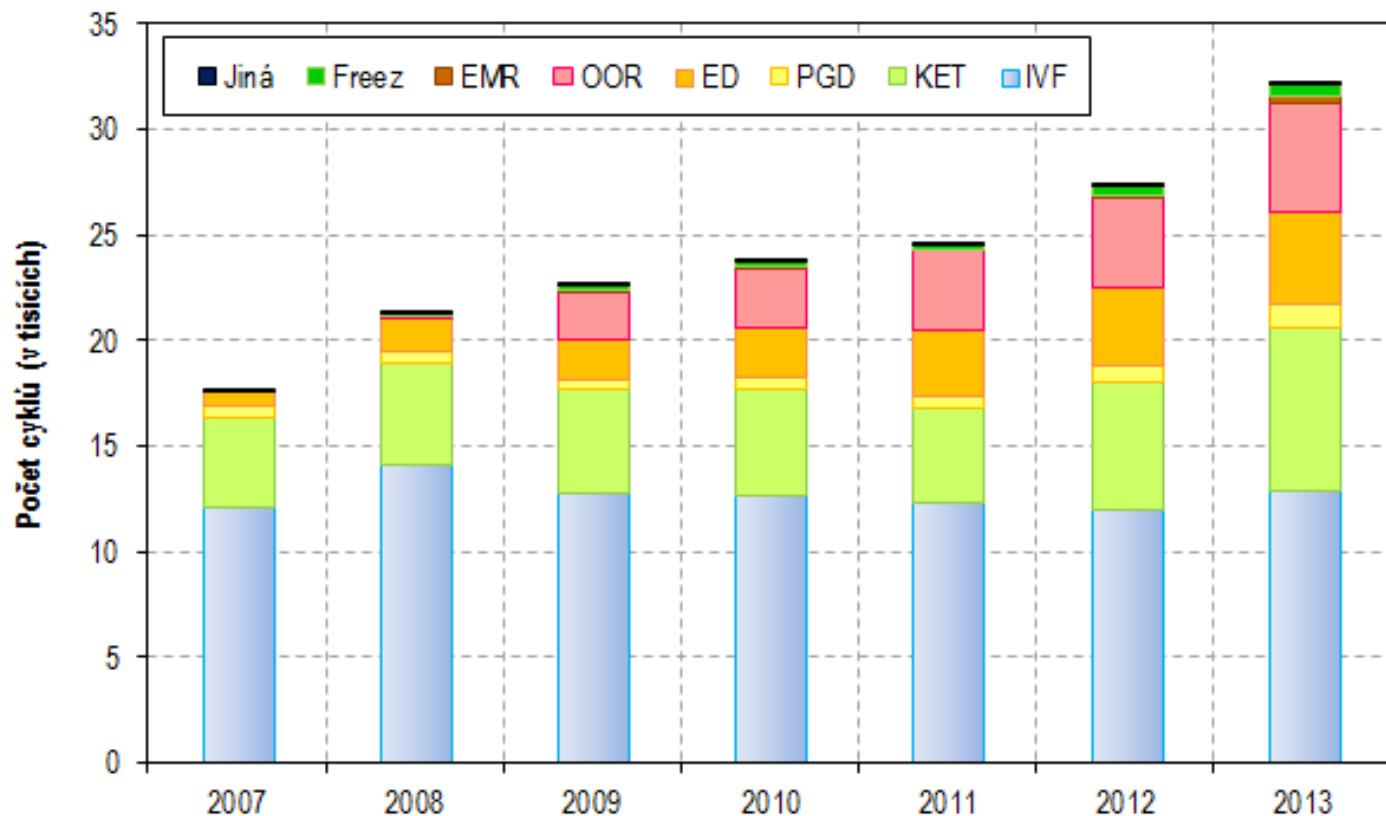
*Public Health Genetics, Murdoch Childrens Research Institute, Parkville, 3052 Victoria, Australia*

---

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



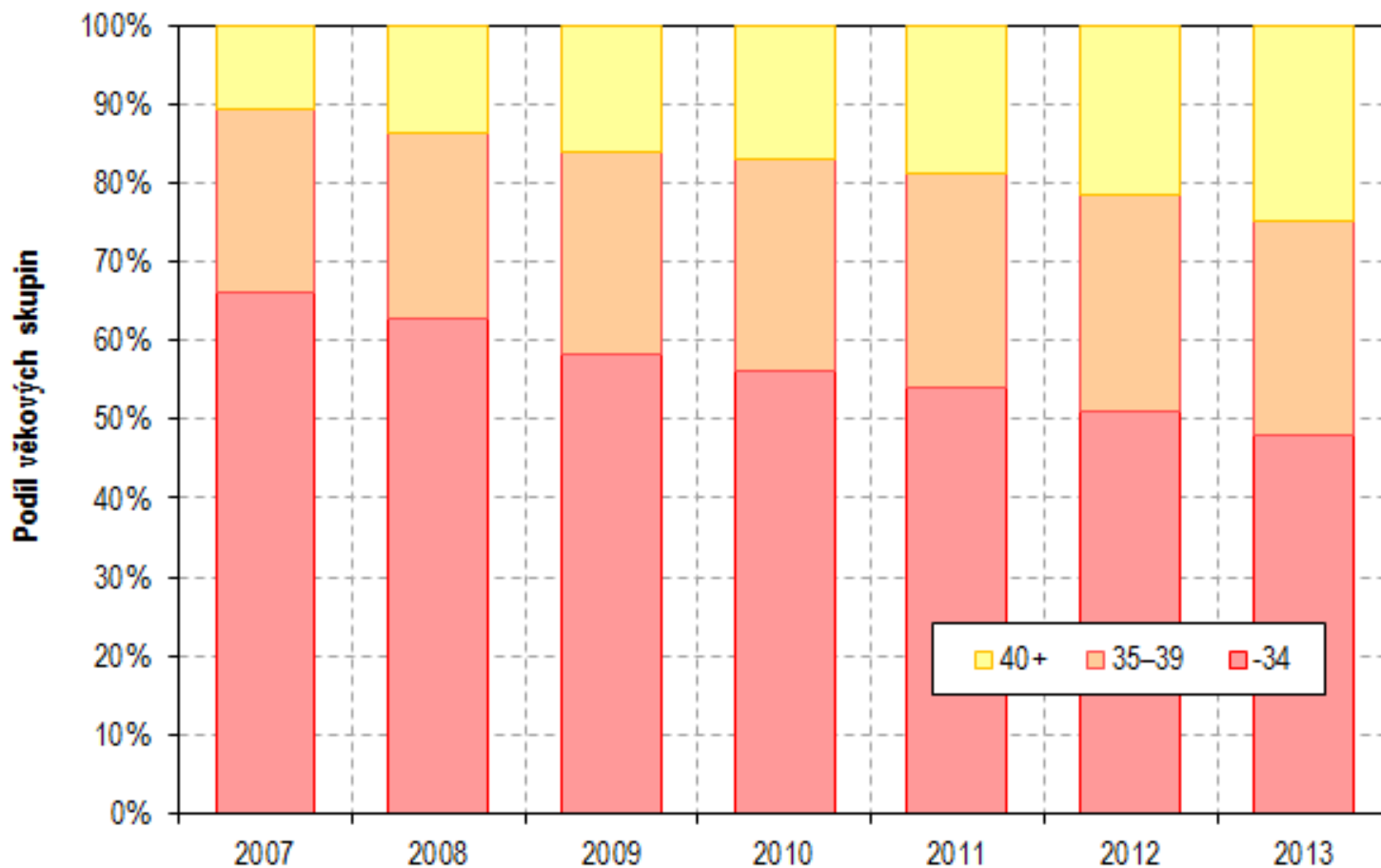
Počet cyklů AR podle zamýšleného cíle, 2007–2013, ČR



Zdroj: Národní registr asistované reprodukce

Pozn.: IVF = mimotělní oplodnění, KET = kryoembryotransfer, PGD = prenatální genetická diagnostika  
 ED = darování oocytů, OOR = příjem darovaných oocytů, EMR = příjem darovaných embryí,  
 Freez = zamražení

### Podíl jednotlivých věkových skupin žen na celkovém počtu cyklů, 2007–2013, ČR



Zdroj: Národní registr asistované reprodukce





# KLONOVÁNÍ ČLOVĚKA

## Variety klonování člověka (dle zamýšleného cíle)

### Reprodukční klonování (Reproductive Cloning)

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

### Terapeutické klonování (Research Cloning)

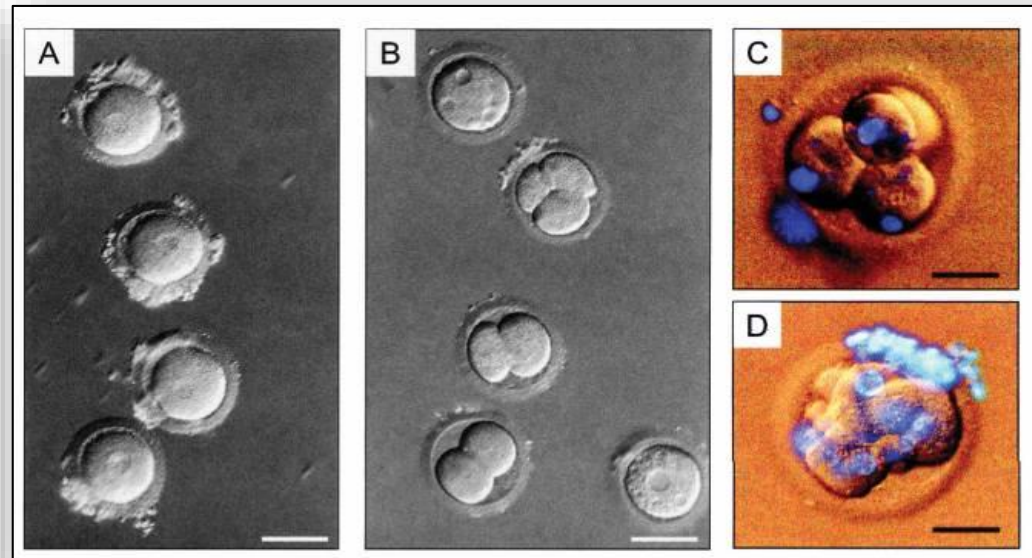
- embryo, vzniklé metodou SCNT, udržováno v podmínkách *in vitro*
- výzkum (genetická kontrola diference)
- izolace ESCs a indukovaná diference (buněčná terapie bez problémů s imunokompatibilitou)

### Tvorba cybridů

2001:

José 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<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.

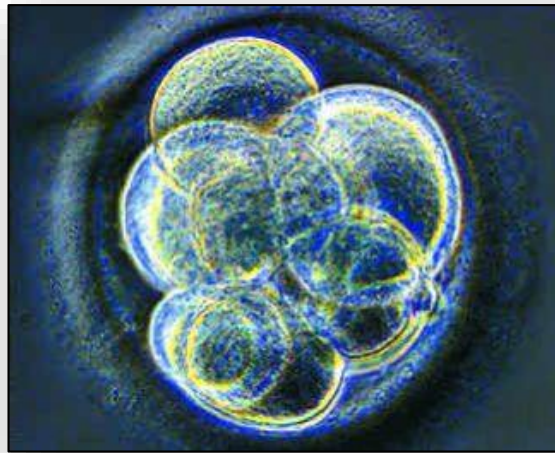
<sup>4</sup> School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

<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.



- 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



[http://www.zavos.org/library/UAAN\\_A\\_150346.pdf](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*







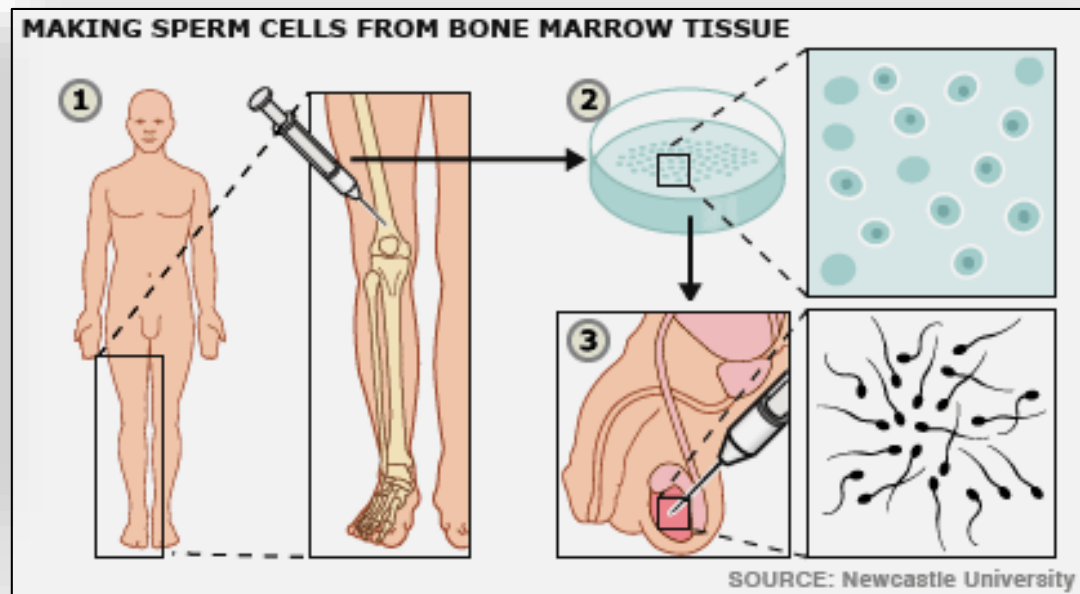
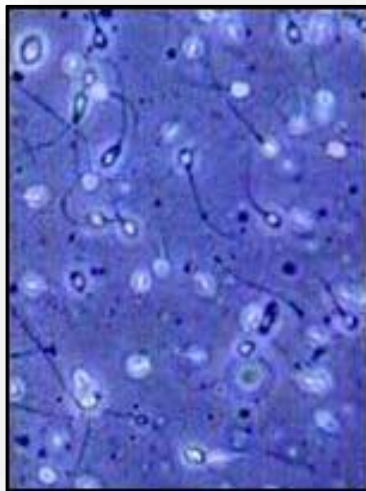
**"Holy great mother of God, I've been cloned!"**



# 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 spermií
- **neověřeno!**



## 2009 - Karim Nayernia

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





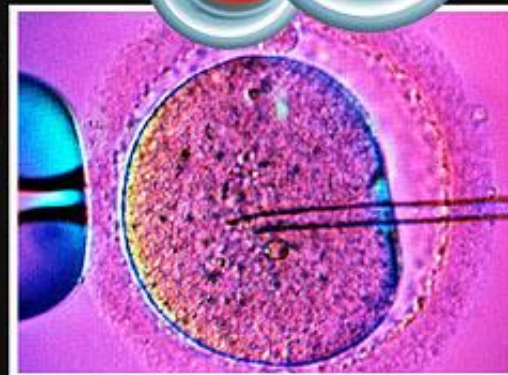


Pioneer:  
Professor  
Karim  
Nayernia

## 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.



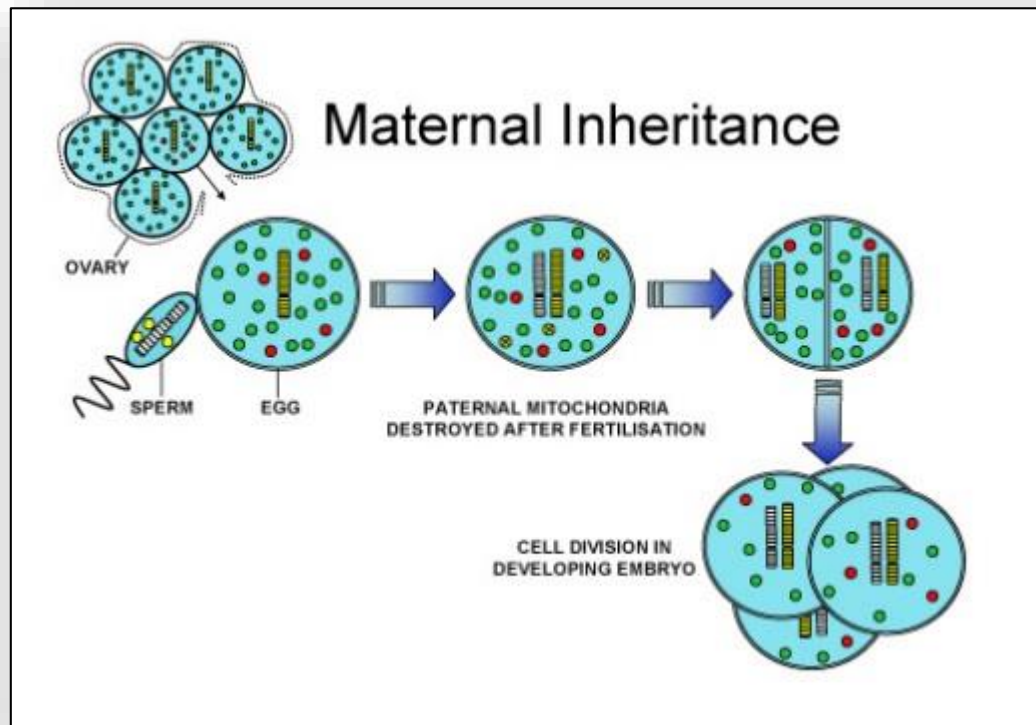
**STEM CELLS:** Blank cells with the power to turn into other cell types, creating a 'repair kit' for the body.

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

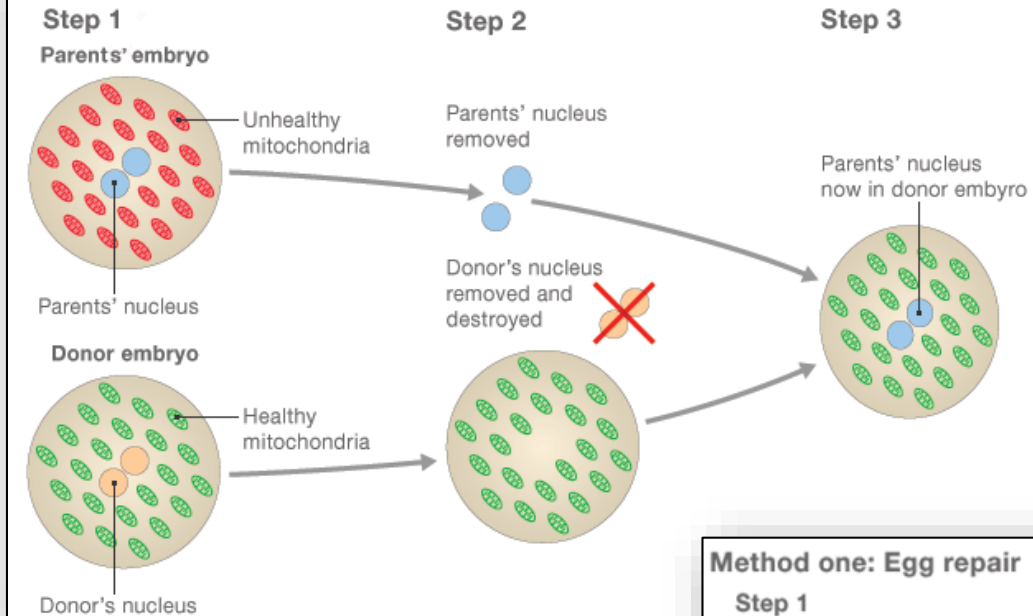


## 2015 – "Three parent babies"

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



### Method one: Embryo repair



### Method one: Egg repair

