

Edice  
ALMA  
MATER

**Tonko Mardešić**

# **MIMOTĚLNÍ OPLODNĚNÍ**

**Faktory ovlivňující úspěšnost léčby**



**Galēn®**

Edice  
ALMA  
MATER

**Tonko Mardešić**

# **MIMOTĚLNÍ OPLODNĚNÍ**

**Faktory ovlivňující úspěšnost léčby**



**Galēn®**

**Vydání podpořili**

**Serono**

Edice  
ALMA  
MATER



**Tonko Mardešić**

# **MIMOTĚLNÍ OPLODNĚNÍ**

**Faktory ovlivňující úspěšnost léčby**

Autor:

MUDr. Tonko Mardešić, CSc.  
Sanatorium Pronatal, Praha

Recenzenti:

prof. MUDr. Pavel Ventruba, DrSc.  
I. gynekologicko-porodnická klinika LF MU, Brno

prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

I. gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Tonko Mardešić

MIMOTĚLNÍ OPLODNĚNÍ

*Faktory ovlivňující úspěšnost léčby*

Edice ALMA MATER, svazek druhý

Vydalo nakladatelství Galén

150 00 Praha 5, Nádražní 116

První vydání

Editor PhDr. Lubomír Houdek

Vedoucí redaktorka PhDr. Soňa Dernerová

Odpovědná redaktorka MUDr. Radmila Samková

Úvodní ilustrace Miroslav Barták

Dokumentace z archívu autora

Na vydání spolupracovali Jarmila Jungwirthová a MUDr. Marie Štědrá

Sazba Blanka Halašková, Galén

Tisk Glos, Semily

2,8 AA – 3,2 VA – 5,5 TA

TS 08/29

MESH-CZ: 1. EMBRYO – PŘENOS

2. FERTILIZACE IN VITRO 3. MIMOTĚLNÍ OPLODNĚNÍ

4. OVULACE – INDUKCE 5. TĚHOTENSTVÍ – VÝSLEDEK

Obory: 1. gynekologie, porodnictví

2. rozmnožování

*Všechna práva vyhrazena.*

*Tato publikace ani žádná její část nesmí být reprodukována, uchovávána v rešeršním systému nebo přenášena jakýmkoli způsobem (včetně mechanického, elektronického, fotografického či jiného záznamu) bez písemného souhlasu nakladatelství.*

Autor i nakladatel vynaložili značné úsilí, aby informace o léčivech odpovídaly stavu znalostí v době zpracování díla. Přesto za ně nakladatelství nenese odpovědnost a doporučuje řídit se údaji o doporučeném dávkování a kontraindikacích uvedených v příbalovém letáku příslušného léčivého přípravku. Týká se to především přípravků vzácněji používaných nebo nově uváděných na trh.

Galén® je chráněná značka – No. 191855

Copyright © Galén, 1998

**ISBN 80-85824-83-3**

# OBSAH

<b>PŘEDMLUVA KE KNIŽNÍMU VYDÁNÍ .....</b>	<b>7</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>1. KLINICKÉ PŘEDPOKLADY PRÁCE A SOUBORY .....</b>	<b>9</b>
<b>2. VLIV VĚKU NA ÚSPĚCH IVF</b>	
<b>A MOŽNOSTI PREDIKCE A OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKU .....</b>	<b>11</b>
2.1. Výsledky IVF v závislosti na věku ženy .....	11
2.1.1. Soubory a metodika .....	13
2.1.2. Výsledky .....	14
2.2. Testování ovariální funkce v souvislosti s věkem .....	15
2.2.1. Soubory a metodika .....	18
2.2.2. Výsledky .....	19
2.3. Ovariální stimulace žen nedostatečně reagujících na obvyklé stimulační protokoly («poor responders») .....	21
2.4. Asistovaný hatching .....	22
2.4.1. Soubory a metodika .....	22
2.4.2. Výsledky .....	23
2.5. Strategie při přenosu embryí .....	25
2.5.1. Soubory a metodika .....	25
2.5.2. Výsledky .....	26
2.6. Dárcovství oocytů .....	27
2.7. Závěry .....	27
<b>3. VLIV OVARIÁLNÍ STIMULACE NA VÝSLEDKY IVF .....</b>	<b>29</b>
3.1. Soubory a metodika .....	30
3.2. Výsledky .....	31
3.3. Závěry .....	32
<b>4. VLIV ANDROLOGICKÉHO FAKTORU V ÉŘE INTRACYTOPLAZMATICKÉ INJEKCE SPERMIE (ICSI) .....</b>	<b>33</b>
4.1. Obstrukční azoospermie .....	36

4.1.1. Aspirace epididymálních spermií .....	36
4.1.2. Extrakce testikulárních spermií .....	37
4.2. Mechanismy fertilizace oocyту po intracytoplazmatické injekci spermie .....	37
4.3. Klinické aspekty ICSI .....	39
4.3.1. Indukce ovulace .....	39
4.3.2. Andrologické a neandrologické indikace intracytoplazmatické injekce (ICSI) .....	39
4.3.3. Kryokonzervace embryí po ICSI .....	43
4.3.4. Těhotenství po ICSI .....	43
4.4. Genetické aspekty ICSI .....	44
4.5. Metodika ICSI .....	45
4.5.1. Příprava spermií .....	45
4.5.2. Příprava oocytů .....	46
4.5.3. Příprava mikropipet .....	47
4.5.4. Přístrojové vybavení pro mikromanipulace .....	47
4.5.5. Mikromanipulace .....	48
4.5.6. Kontrola oplození .....	49
4.6. Výsledky .....	50
4.7. Závěry .....	54
<b>5. SELEKCE EMBRYÍ PRO TRANSFER (PRODLOUŽENÁ KULTIVACE EMBRYÍ) .....</b>	<b>55</b>
5.1. Soubory a metodika .....	57
5.2. Výsledky .....	59
5.3. Závěr .....	59
<b>6. KRYOKONZERVACE EMBRYÍ .....</b>	<b>60</b>
6.1. Soubor a metodika .....	63
6.2. Výsledky .....	64
6.3. Závěr .....	66
<b>7. OSUD TĚHOTENSTVÍ A PERINATÁLNÍ VÝSLEDKY V SOUBORU TĚHOTNÝCH ŽEN PO IVF A ET .....</b>	<b>67</b>
7.1. Soubor a metodika .....	67
7.2. Výsledky .....	68
7.3. Závěry .....	70
<b>PODĚKOVÁNÍ .....</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>73</b>
<b>AUTOR .....</b>	<b>87</b>

---

# **PŘEDMLUVA KE KNIŽNÍMU VYDÁNÍ**

Tato publikace není učebnicí či monografií s cílem podrobně popsat jednotlivé etapy léčby sterility metodou mimotělního oplodnění. Snahou autora je poukázat na možnosti, které jsou k dispozici a které umožňují zvýšit efektivitu rutinních léčebných postupů. V současné době, kdy se téměř denně objevují nové informace a nové postupy, není zcela snadné se v nich orientovat a sledovat jejich skutečný klinický dopad na každodenní praxi.

Doufám proto, že uvedené informace, zahrnující jak literární přehledy k dané problematice, tak i vlastní praktické zkušenosti, budou přínosem nejen pro ty, kteří v oblasti asistované reprodukce aktivně působí, ale i pro gynekology a porodníky, kteří se s páry léčenými metodami asistované reprodukce dostávají běžně do styku a v neposlední řadě i pro odborníky v navazujících oborech, neboť asistovaná reprodukce se rozvíjí jako typicky interdisciplinární odvětví medicíny.

*autor*



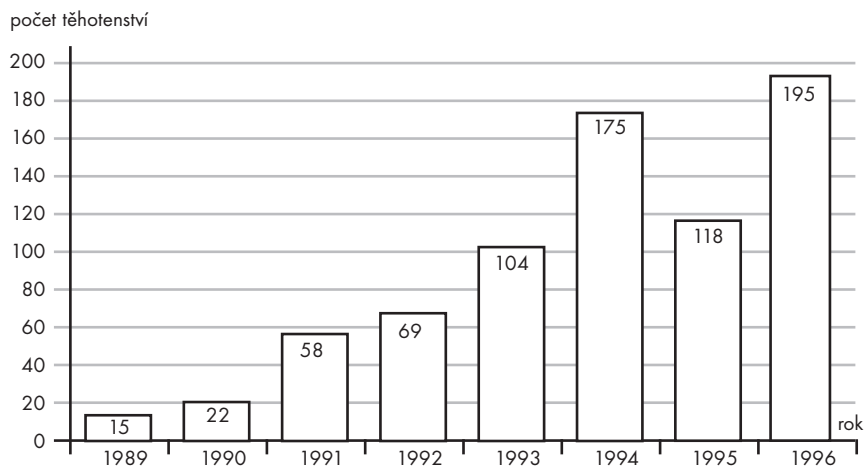
# ÚVOD

Léčba sterility metodou mimotělního oplodnění (in vitro fertilizace) spolu s ostatními metodami asistované reprodukce již dávno opustila rámec klinického experimentu a stala se rutinním postupem při terapii nedobrovolně bezdětných manželství. Vzhledem ke stálému zvyšování efektivity těchto metod se trvale zužují indikace pro tzv. »klasické« léčebné postupy a stále se rozšiřují indikace asistované reprodukce – především in vitro fertilizace (IVF). Původní indikace – jinak neléčitelná tubární sterilita – byla brzy rozšířena o nevysvětlitelnou (idiopatickou) sterilitu, sterilitu při endometrióze, andrologicky podmíněnou neplodnost a sterilitu podmíněnou přítomností protilátek negativně ovlivňujících reprodukční procesy. Dalším krokem bylo zavedení léčby neplodnosti pomocí darovaných oocytů.

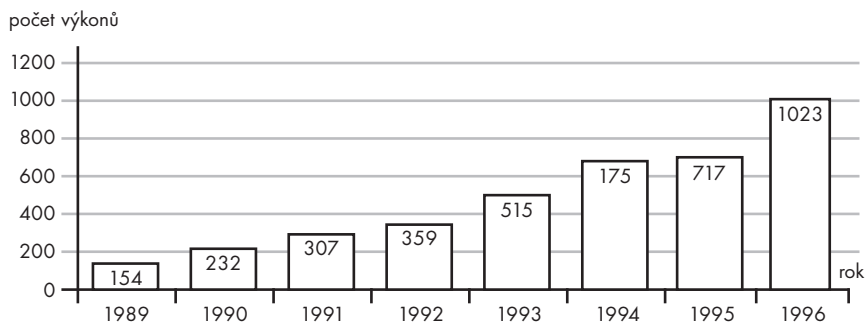
Celosvětový rozvoj in vitro fertilizace přinesl exponenciální nárůst poznatků z oblasti biologie reprodukce a dosud nevídaným způsobem změnil přístup k terapii neplodnosti. I v samotné in vitro fertilizaci došlo během její relativně krátké historie k řadě zásadních změn: ultrazvukem kontrolované punkce folikulů umožnily provádět tuto léčbu ambulantně, zavedení agonistů GnRH do ovariální stimulace zajistilo mnohem dokonalejší kontrolu folikulární fáze cyklu, rutinní kryokonzervace embryí řeší etický problém tzv. nadpočetných embryí a zvyšuje úspěšnost IVF bez nutnosti podstupovat opakovanou stimulaci a punkci folikulů, intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) přinesla zásadní obrat při léčbě závažných případů andrologicky podmíněné sterility. Přestože v kvalitních centrech je efektivita IVF plně srovnatelná s efektivitou přirozené reprodukce, údaje z celosvětového registru zaznamenávají jen pozvolné zvyšování procenta implantovaných embryí. Identifikace a rozbor vlivu jednotlivých faktorů na efektivitu IVF jsou nejen nezbytnou podmínkou dalšího rozvoje metody, ale i základním předpokladem pro objektivní a úplné informování neplodného páru před zahájením plánované terapie.

# 1. KLINICKÉ PŘEDPOKLADY PRÁCE A SOUBORY

Rozsah vlastního materiálu, ze kterého vycházíme, a klinickou zkušenost (počty cyklů s aspirací, počty dosažených těhotenství) dokumentují grafy 1 a 2.



Graf 1. Klinická těhotenství v programu IVF 1989–1996 (ÚPMD, Pronatal)



Graf 2. Punkce folikulů v programu IVF 1989–1996 (ÚPMD, Pronatal)

V práci jsou uvedeny literární přehledy a vlastní zkušenosti a výsledky v problematice týkající se:

- vlivu věku na úspěch IVF a možnosti predikce a ovlivnění výsledku;
- vlivu ovariální stimulace na výsledky IVF;
- vlivu andrologického faktoru v éře intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI);
- možnosti selekce nejkvalitnějších embryí pro embryotransfer (prodloužená kultivace embryí);
- kryokonzervace embryí;
- osudu těhotenství a perinatálních výsledků u žen těhotných po léčbě metodou mimotělního oplodnění oocyty.

## 2. VLIV VĚKU NA ÚSPĚCH IVF A MOŽNOSTI PREDIKCE A OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKU

### 2.1. Výsledky IVF v závislosti na věku ženy

V hospodářsky vyvinutých zemích (a v posledních letech zřetelně i v ČR) je evidentní trend odsunu porodu prvního dítěte až po ukončení vzdělání a zajištění profesionální dráhy. Např. v USA rodí v současné době každá pátá žena své první dítě po 35. roce věku. Tento odklad zvyšuje riziko kontaktu s některou ze sexuálně přenosných chorob s následným postižením tubární funkce, a také pravděpodobnost snadné a nekomplikované koncepce se s věkem snižuje. Klesající přirozená fertilita ženy se stoupajícím věkem je proces komplexní a multifaktoriální, zřetelně dokumentovaný řadou prací.<sup>(58,115,124)</sup> Uplatňuje se pokles koitální aktivity, klesá počet normálních ovulačních cyklů a naopak narůstá procento cyklů abnormálních, zvyšuje se význam uterinního faktoru sterility.<sup>(77)</sup> Méně známou skutečností je exponenciální nárůst chromosomálních aberací. U žen nad 40 let je pravděpodobně většina embryí aneuploidních a genetické příčiny se tak významně uplatňují v etiologii sterility starších žen.<sup>(68)</sup> V jedné z nejznámějších prací Schwartz a Mayaux analyzovali výsledky intrauterinních inseminací spermiemi dárce u 2193 žen azoospermických mužů a prokázali, že pokles fertility začíná již od 30. roku věku.<sup>(177)</sup> Odklad těhotenství a expozice negativním vlivům ovlivňujícím fertilitu spolu s přirozeným poklesem fertility vede k nárůstu nedobrovolně bezdětných manželství s nutností konzultace specializovaného pracoviště. Věk je proto mimořádně důležitým faktorem i při plánování diagnostických a terapeutických postupů. U starších žen je nutno trvat na co nejvčasnějším předání páru do péče specializovaného centra asistované reprodukce.

Přestože je situace při in vitro fertilizaci odlišná od spontánní koncepce (jsou transferována vybraná nej kvalitnější embrya), je věk považován za jeden z nejdůležitějších prognostických faktorů při IVF. Vzhledem k přirozenému poklesu fertility a vyšší incidenci genetických anomálií u potomstva odmítá řada IVF center pacientky

nad 40 let věku. Neuspokojivé výsledky v této věkové kategorii jsou dány především nedostatečnou reakcí na ovariální stimulaci<sup>(43,42)</sup> a sníženou receptivitou endometria.<sup>(35,42,50)</sup> Lze jednoznačně prokázat, že procento oplozených oocytů u starších žen se neliší od žen mladších, ale při stejném počtu transferovaných embryí je výrazně nižší implantace. To může být podmíněno jednak děložním faktorem (myomatóza, snížená vaskularizace endometria, porucha syntézy prostaglandinů, luteální insuficience), jednak nižší kvalitou embryí,<sup>(61,151)</sup> resp. jejich omezenou životností. Kromě výsledků z animálních experimentů podporují tento předpoklad i údaje o častějším výskytu neúspěšných těhotenství u starších žen, u nichž však příčinou není chromosomální aberace.<sup>(151)</sup> Uváděná věková hranice pro »normální« úspěšnost IVF – 36 až 37 let<sup>(50)</sup> – je v soulase s výsledky prací zabývajících se poklesem přirozené fertility.<sup>(192)</sup> Výsledky z registru American Fertility Society<sup>(185)</sup> vykazují 10,8 % těhotenství ukončených porodem u čtyřicetiletých žen a starších oproti 30,4 % u žen mladších. Tan ve své práci<sup>(204)</sup> prokázal kumulativní procento těhotenství po pěti IVF cyklech 45–54 % u žen mezi 20–34 lety, oproti 14,4 % u žen nad 40 let věku.

Nový pohled na problematiku přinesly práce o terapii darovanými oocyty u žen se syndromem předčasné menopauzy. Velmi povzbudivé výsledky vedly k představě, že »reprodukční stárnutí« (reproductive aging) je dáno spíše izolovaným poklesem kvality oocytů než uterinními faktory.<sup>(124,159)</sup> Jednou z možností, jak oddělit kvalitu embryí od receptivity endometria, je čistě matematicky posoudit dosažená těhotenství a vícečetné implantace. Zatímco jakákoli implantace embrya je známkou přítomnosti receptivního endometria, vícečetná implantace odráží kvalitu oocytů a embryí.<sup>(186)</sup> Jasným důkazem vlivu oocytů na výsledky je i signifikantně vyšší počet těhotenství v případech, kdy věk dárkyně je nižší než 30 let.<sup>(155)</sup> V pokusech na zvířatech byla dokumentována signifikantně nižší implantace v těch případech, kdy byla embrya mladších samic transferována starším příjemkyním.<sup>(4)</sup> Tyto nálezy svědčí pro sníženou receptivitu endometria podmíněnou věkem. Podobné studie v humánní medicíně však přinesly rozporné výsledky. Řada autorů na základě dosaženého procenta implantací usuzuje, že děložní faktor není v těchto případech v popředí.<sup>(124,159)</sup> Existují však i práce svědčící o opaku. Abdalla<sup>(1)</sup> prokázal signifikantně horší výsledky u žen nad 40 let (16 %) oproti ženám mladším (36 %). V jiné studii Levrana byla věková hranice ještě nižší – 14% úspěšnost u žen nad 33 let a 31% úspěšnost u žen mladších.<sup>(89)</sup> Tuto teorii příznávající význam uterinnímu faktoru na pokles fertility starších žen podporuje i studie Chetkowského, kdy uterinní receptivita 0,42 % u žen mladších 40 let poklesla na 0,29 % u žen starších.

Existují však doklady o tom, že vysoké dávky progesteronu v luteální fázi mohou korigovat uterinní faktor sterility.<sup>(113)</sup> Základním předpokladem implantace je sekreční přeměna endometria vlivem progesteronu, která je závislá na dávce a délce expozice a na reaktivitě endometria. Porucha tohoto procesu byla významně častěji nalezena u žen nad 35 let.<sup>(199)</sup> Navot a spol. ukázali, že vyšší dávky progesteronu urychlí sekreční transformaci endometria.<sup>(123)</sup> Vyšší procento těhotenství u žen nad 40 let po aplikaci vyšších dávek progesteronu je v souladu s nálezy opožděné a nedostatečné sekreční přeměny po aplikaci fyziologických dávek tohoto hormonu.<sup>(170)</sup> Tato abnormální reakce na progesteron u starších žen může být způsobena poklesem estrogenních receptorů, které jsou »promotory« endometriálních progesteronových receptorů.<sup>(64)</sup> Tuto možnost podporují i nálezy nižšího endometria po ovariální stimulaci u starších žen.<sup>(172)</sup> Tento defekt je korigovatelný suprafyziologickými dávkami progesteronu, což je v soulase s uspokojivými výsledky IVF s darovanými oocyty u žen nad 40 let, u kterých byla denní dávka progesteronu až 150 mg.<sup>(124,159)</sup>

Dalším aspektem snížené fertility starších žen je vyšší incidence spontánních potratů.<sup>(122)</sup> Procento potratů žen starších než 40 let se pohybuje mezi 41–62,5 %.<sup>(45,137,151,185)</sup> Tyto údaje korelují s nálezem Levrana, který zjistil, že procento potratů je v souvislosti s věkem dárkyně a nikoli příjemkyně.<sup>(89)</sup> To svědčí pro to, že těhotenské ztráty starších žen jsou způsobeny především abnormalitou oocytů, zejména chromosomální.<sup>(89,148)</sup> Malá naděje na těhotenství ukončené porodem zdravého plodu vedla řadu pracovišť k věkovým limitům omezujícím dostupnost terapie. Tento postup však byl opakovaně zpochybněn, neboť reakce na stimulaci a výsledky terapie mnohem více korelují s tzv. »ovariálním věkem« (ovarian age) než s věkem biologickým.<sup>(112)</sup>

### 2.1.1. Soubory a metodika

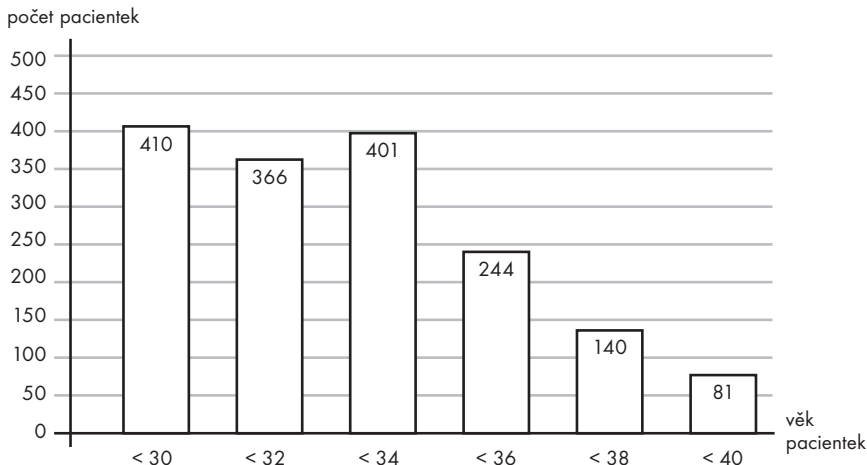
Studie zahrnuje 1642 žen léčených naším týmem v programu IVF a ET rozdělených do věkových kategorií po dvou letech a stimulovaných obvyklými stimulačními protokoly. Vzhledem k rozsahu souboru byla část žen stimulována ještě »staršími« protokoly kombinujícími klomifencitrát a gonadotropiny (hMG) nebo hMG samotným. V posledních letech se používají téměř výhradně stimulační protokoly využívající analoga GnRH (v krátkém či dlouhém schématu). Monitorování zahajujeme osmý den cyklu stanovením hladin 17- $\beta$ -estradiolu a progesteronu a ultrazvukovým vyšetřením. Choriový gonadotropin 10 000 j. i.m. se aplikuje tehdy, kdy dominantní folikul dosáhne velikosti 18–20 mm za přítomnosti nejméně dalších

dvou folikulů alespoň 16 mm v průměru. Další podmínkou je stoupající hladina estradiolu a nízká hladina progesteronu nesvědčící pro luteinizaci folikulů in situ. Odběr oocytů (34–36 h po aplikaci hCG) provádíme transvaginální punkcí v krátké celkové anestézii. Luteální podporu aplikujeme u všech pacientek po transferu embryí podle reakce na ovariální stimulaci – buď pomocí hCG (1500 j. i.m. obden celkem 6x), nebo progesteronu (60 mg i.m. celkem 11x) počínaje dnem přenosu embryí. V poslední době se všem pacientkám podává vaginálně mikronizovaný progesteron 2x 100 mg denně.

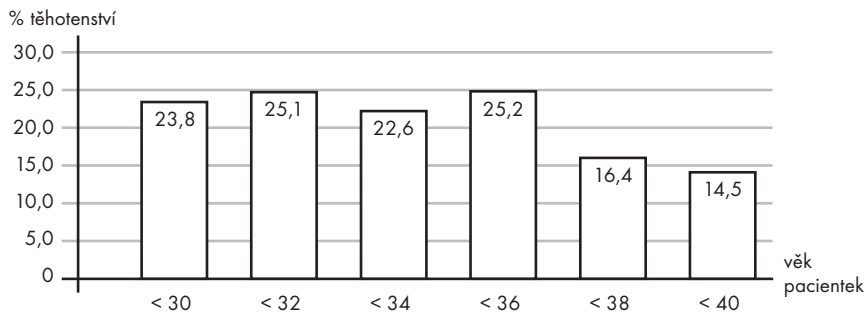
### 2.1.2. Výsledky

Počty pacientek v jednotlivých věkových skupinách dokumentuje graf 3. Věková hranice, kdy nastává pokles efektivity metody, je (ve shodě s pracemi ve světové bibliografii) 36–37 let. Ačkoli oproti spontánní koncepci jsou při IVF přenášena do dělohy vybraná nej kvalitnější embrya, je zde jasně patrný vliv věku na dosahované výsledky. Graf 4 zřetelně dokládá pokles úspěšnosti u skupiny žen starších než 37 let.

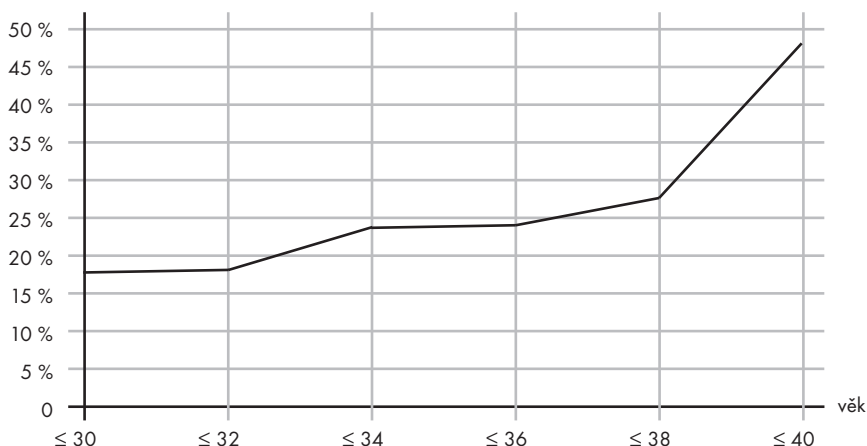
Klesající fertilitu ženy se stoupajícím věkem doprovází snižování tzv. ovariální rezervy, a proto současně klesá reakce na exogenní stimulaci. Sledujeme-li ovariální reaktivitu na neselektovaném souboru, můžeme jednoznačně prokázat pokles citlivosti ovarií na exogenní stimulaci (graf 5). U žen ve věku kolem 40 let bylo pro nedostatečnou reakci na exogenní gonadotropiny přerušováno až 50 % IVF cyklů.



Graf 3. Věková struktura IVF souboru



Graf 4. Těhotenství/punkce v závislosti na věku



Graf 5. Přerušené cykly v závislosti na věku bez předchozí selekce pacientek

## 2.2. Testování ovariální funkce v souvislosti s věkem

Výsledkem zvyšujícího se »ovariálního věku« je snížení ovariální funkce a ovariální rezervy projevující se nedostatečnou či abnormální reakcí na ovariální stimulaci.<sup>(212)</sup> V těchto případech se při ovariální stimulaci vyvíjí pouze jeden či dva folikuly a cyklus se přerušuje nebo pokračuje s minimální nadějí na úspěch. Tuto skupinu žen (poor responders) je zapotřebí identifikovat ještě před zahájením vlastní stimulace.

Muasher<sup>(119)</sup> sledoval predikční hodnotu bazální hladiny gonadotropinů na výsledek terapie a zjistil, že stanovení bazální hladiny FSH umožňuje diferencovat skupiny pacientek odlišně reagujících na stimulaci, lišící se počtem získaných oocytů, transferovaných



embryí a dosažených těhotenství. Ke stejnému závěru dospěl ve své práci i Scott.<sup>(164)</sup> Toner analyzoval 1478 po sobě jdoucích IVF cyklů a zjistil kontinuální pokles počtu těhotenství v závislosti na stoupajících hodnotách FSH.<sup>(212)</sup> Také riziko přerušení cyklu pro nedostatečnou reakci stoupalo v závislosti na hladině FSH, neprokázal však jednoznačnou závislost mezi věkem a rizikem přerušení cyklu. Tito autoři uzavírají, že bazální hladina FSH lépe koreluje s reaktivitou na stimulaci než věk. Navot<sup>(125)</sup> zavedl do praxe tzv. test ovariální rezervy (ovarian challenge test). Prospektivně hodnotil reaktivitu ovarií u 51 žen starších než 35 let, které měly bazální hladiny FSH v normě. Po podání 100 mg klomifencitrátu 5.–9. den menstruačního cyklu došlo u 18 z nich 10.–11. den cyklu ke zvýšení FSH na více než 26 mIU/ml (více než 2 SD). V této skupině otěhotněla pouze jedna pacientka ve srovnání se 14 těhotnými z 33 žen s normálními hladinami FSH po stimulaci klomifencitrátem. Tanbo<sup>(205)</sup> ve své práci potvrdil, že »poor responders« s abnormální hodnotou FSH po stimulaci klomifencitrátem mají malou naději na dosažení těhotenství v programu in vitro fertilizace – 4 % těhotenství u poor responders oproti 33 % u žen s normální odpovědí. V další práci<sup>(207)</sup> dospěl k závěru, že výsledky testu ovariální rezervy mají vyšší predikční hodnotu než vyšetření bazálních hladin FSH. Loumaye navrhl použití součtu bazálních hodnot FSH a jejich hladiny 10.–11. den cyklu po stimulaci klomifencitrátem.<sup>(94)</sup> Jako kritickou stanovil hodnotu FSH 26,03 mIU/ml. Počet aspirovaných folikulů, získaných oocytů a přenášených embryí byl v průměru 6x nižší u žen, které překročily tuto hranici, oproti skupině s výsledky pod stanovenou hodnotou. Olivennes s úspěchem použil test ovariální rezervy s exogenním FSH.<sup>(133)</sup> Aplikoval 300 IU třetí den cyklu a sledoval hodnoty estradiolu a bazální hladiny FSH před podáním exogenního FSH a hladinu estradiolu 24 h po podání gonadotropinu. Bazální hodnoty FSH vyšší než 10 mIU/ml a zvýšení estradiolu o méně než 30 pg/ml identifikovaly pacientky s mimořádně špatnou prognózou. Sledováním predikčního významu vzestupu 17 $\beta$ -estradiolu se zabývali i další autoři, avšak využili flare-up efektu po podání analog GnRH. Padilla<sup>(136)</sup> našel ve svém souboru pouze 6 % těhotenství u žen s chybějícím vzestupem hladiny estradiolu v souvislosti s flare-up oproti 37 % těhotenství v případech, kdy po podání GnRH analog došlo k vzestupu 17- $\beta$ -estradiolu. Význam sledování těchto parametrů potvrdil i Winslow.<sup>(234)</sup> U žen, u kterých nedošlo k dvojnásobnému zvýšení hladiny estradiolu mezi 2. a 3. dnem cyklu po flare-up, našel významně vysoké procento (39 %) přerušených cyklů pro abnormální odpověď na stimulaci.

### **Skryté (okultní) ovariální selhání**

Stárnutí je pouze jedním z procesů, které redukuje počet folikulů – dále se mohou také uplatňovat chirurgické výkony na ováriích, chemoterapie a radioterapie. Stejně jako nástup menopauzy je i pokles fertility v závislosti na věku individuální. Z výše uvedeného vyplývá, že velmi citlivým ukazatelem stavu ovárií je hladina FSH. S klesající ovariální funkcí stoupá hladina FSH,<sup>(90)</sup> zřejmě jako odraz klesající produkce inhibinu klesajícím počtem gonadotropin-senzitivních folikulů.<sup>(23)</sup> Existuje předpoklad, že hladina FSH je přímý a citlivější indikátor stavu ovárií (ovarian age) než biologický věk. Cameron<sup>(23)</sup> popsal tzv. skryté (okultní) ovariální selhání charakterizované triádou: sterilita, pravidelný menstruační cyklus a hypergonadotropní stav. Ovariální steroidogeneze je přitom zachována, zřejmě však jen za cenu zvýšené sekrece FSH. Hladina inhibinu u těchto žen byla normální, což podporuje domněnku, že tento stav zachycuje kompenzované ovariální selhání. V práci Tonera<sup>(212)</sup> byla ve všech kategoriích bazální hladina FSH lepším ukazatelem výsledku IVF než biologický věk: v procentu přerušovaných cyklů, maximální dosažené hladině estradiolu, počtu aspirovaných folikulů, počtu získaných i fertilizovaných oocytů, v počtu transferovaných embryí i v počtu dosažených těhotenství. Také Gindoff a Jewelewicz zjistili, že bazální hladina FSH je nejsenzitivnějším ukazatelem umožňujícím odhalit perimenopauzální stav.<sup>(58)</sup> Doporučují zařadit do programu IVF i ženy starší než 40 let, je-li jejich hormonální profil bez známek klesající ovariální funkce. Naproti tomu i u výrazně mladších žen lze očekávat velmi špatné výsledky při zvýšené bazální hladině FSH a poměru FSH:LH > 1.<sup>(23,58)</sup> Ve skupině 88 pacientek nově zařazených do programu IVF našel Muasher ve 40 % poměr FSH:LH = 1:1 (při hladině obou pod 10 mIU/ml), 34 % mělo vyšší hladinu LH než FSH a u 26 % byl poměr FSH:LH > 1.<sup>(119)</sup> Tato situace je tedy u pacientek v programu IVF relativně častá.

Hladina FSH stoupá ve druhé polovině luteální fáze a klesá ve druhé polovině folikulární fáze jako následek modulačního efektu 17 $\beta$ -estradiolu, inhibinu a pravděpodobně i dalších gonadálních hormonů na hypotalamo-hypofýzo-ovariální osu. Je zřejmé, že rovnováha mezi produkcí ovariálních steroidů a sekrecí gonadotropinů odráží schopnost ovaria odpovídat na stimulaci a nepřímo reprodukční potenciál pacientky. Rovnovážný stav mezi stimulačními a supresivními vlivy na hladinu FSH třetí den menstruačního cyklu určuje optimální časování vyšetření FSH, které zde odráží reprodukční potenciál.<sup>(164)</sup>

Při jednou zachycené zvýšené bazální hladině FSH jsou výsledky IVF špatné i v případě její pozdější normalizace.<sup>(163)</sup> Tato variabilita je patrně odrazem intermitentního ovariálního selhávání v prime-

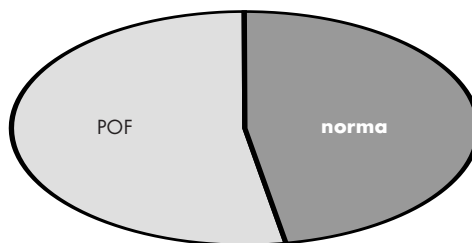
nopauze.<sup>(173)</sup> Lze předpokládat, že zbývající oocyty jsou za této situace již nekvalitní i v endokrinologicky normálních cyklech.

### 2.2.1. Soubory a metodika

Hodnotili jsme reakci na ovariální stimulaci (a zejména počet přerušovaných cyklů pro nedostatečnou odpověď) u 697 žen zařazených do IVF programu bez předchozí aplikace jakýchkoli selektivních kritérií. U 35 žen, jejichž cyklus byl pro nedostatečnou reakci přerušen, jsme za dva měsíce vyšetřili bazální hladiny FSH se zřetelem na tzv. skryté (okultní) ovariální selhání.

Následně jsme před zařazením do programu IVF vyšetřili 41 žen testem ovariální rezervy (stanovení bazálních hladin gonadotropinů třetí den menstruačního cyklu a jejich opakované zhodnocení po pětidenním podání 100 mg klomifencitrátu spolu se stanovením hladin  $17\beta$ -estradiolu). Za tři měsíce po provedení tohoto testu byly pacientky stimulovány v léčebném IVF cyklu kombinovaným podáním klomifencitrátu a hMG v obvyklých schématech. Podle odpovědi na stimulaci hodnocenou maximální dosaženou hladinou  $17\beta$ -estradiolu byly pacientky rozděleny do čtyř skupin (1. přerušené cykly pro nedostatečnou odpověď u žen, kde se nejednalo o POF, 2. estradiol < 1200 pg/ml («low responders»), 3. estradiol > 1200 pg/ml, 4. skryté ovariální selhání a reakce na stimulaci byla korelována s jednotlivými parametry testu ovariální rezervy. Sledování hladin LH jsme v souhlase s literaturou vyřadili a hodnotili pouze hladiny FSH před stimulací a po ní klomifencitrátem a  $17\beta$ -estradiolem. Statistické hodnocení bylo pro přehlednost a grafickou znázornitelnost provedeno testem 95% spolehlivosti (čím více dysjunktní jsou znázorněné intervaly, tím větší je významnost testované hypotézy).

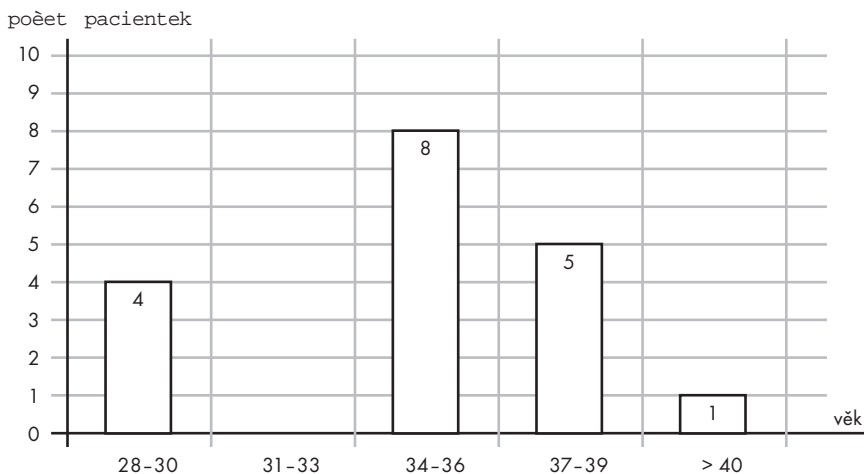
Plazmatické hladiny estradiolu a progesteronu byly měřeny pomocí RIA (Amersham).



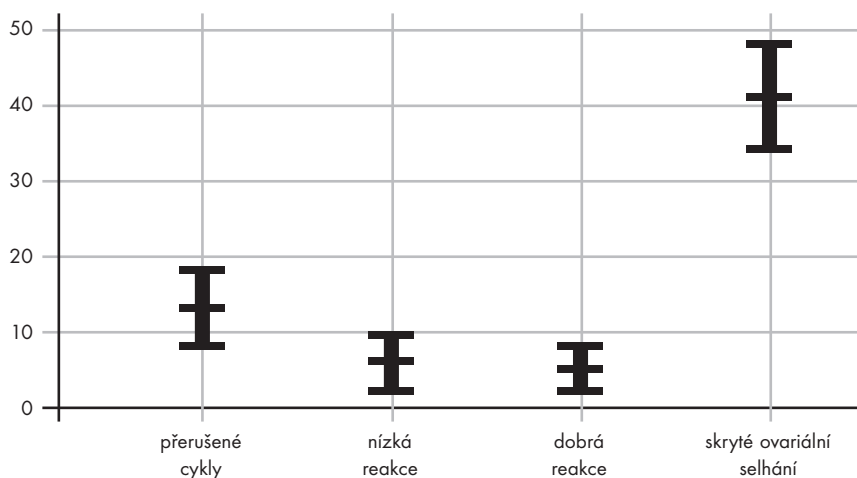
Graf 6. Výskyt skrytého ovariálního selhání (POF) u žen s přerušenými IVF cykly

### 2.2.2. Výsledky

Výskyt skrytého ovariálního selhání v neselektovaném souboru pacientek, v němž byla ovariální stimulace přerušena pro neadekvátní reakci, ukazuje graf 6. Z 35 vyšetřených žen splnilo 18 pacientek (51,4 %) kritéria pro zařazení do souboru s okultním ovariálním selháním. Při sledování věku pacientek (graf 7) bylo z 18 pacientek 14 ve věkové skupině > 35 let.



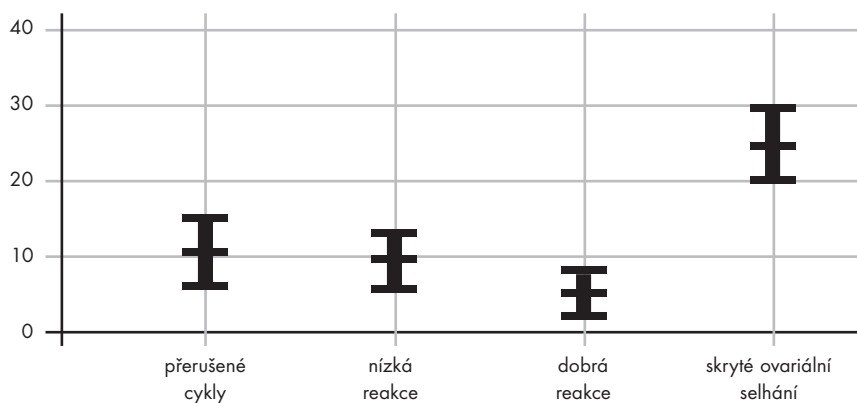
Graf 7. Skryté ovariální selhání v jednotlivých věkových kategoriích



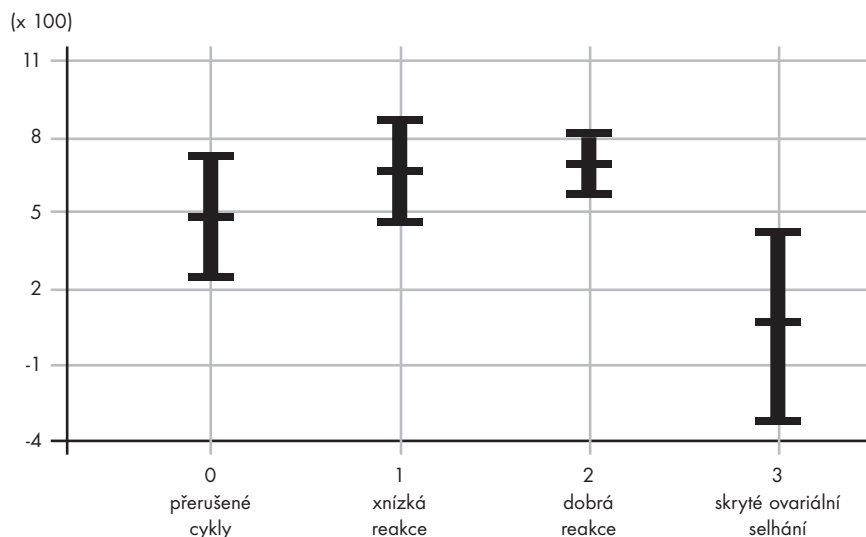
Graf 8. Predikční hodnota bazální hladiny FSH

Vzhledem k relativně častému výskytu skrytého ovariálního selhání v IVF populaci vystupuje do popředí otázka včasné detekce. Naše zkušenosti s použitím testu ovariální rezervy podle Navota zachycují grafy 8, 9 a 10 posuzující prediktivní hodnotu jednotlivých sledovaných parametrů na reakci pacientky na ovariální stimulaci. Ve výsledcích jasně vystupuje skupina žen se skrytým ovariálním selháním, bazální hladiny FSH hodnocené třetí den menstruačního cyklu se navíc liší u žen s dobrou odpovědí na stimulaci a u pacientek s přerušenými cykly pro neadekvátní reakci.

Z literatury i našich výsledků vyplývá, že sledování bazální hladiny FSH umožňuje včasný záchyt žen se skrytým ovariálním se-



Graf 9. Predikční hodnota FSH po stimulaci klomifencitrátem



Graf 10. Predikční hodnota 17-β - estradiolu po stimulaci klomifencitrátem

lháním. Toto vyšetření by mělo patřit mezi základní vyšetření především u pacientek starších 35 let.

### **2.3. Ovariální stimulace žen nedostatečně reagujících na obvyklé stimulační protokoly («poor responders»)**

Ačkoli první úspěšné těhotenství po IVF bylo dosaženo ve spontánním nestimulovaném cyklu,<sup>(198)</sup> výhody ovariální stimulace jsou dnes neoddiskutovatelné. Vyšší počet získaných oocytů dává možnost výběru nejkvalitnějších embryí pro embryotransfer, transfer 2–4 embryí zvyšuje naději na dosažení těhotenství a kryokonzervace »nadpočetných« embryí dále zvyšuje efektivitu IVF. S nedostatečnou reakcí na ovariální stimulaci se setkáváme především u starších žen a představuje nejčastější příčinu přerušení léčebného IVF cyklu před provedením punkce folikulů. Definice nedostatečné reakce není v literatuře jednotná,<sup>(35,71,120,206)</sup> nejčastěji se znižuje hladina estradiolu < 300 pg/ml a méně než tři folikuly > 15 mm před aplikací hCG. Stimulace »low responders« patří k jedné z nejproblematictějších oblastí asistované reprodukce. Prosté zvýšení dávky gonadotropinů nevede automaticky k vyšší ovariální odpovědi, např. Ben-Rafael<sup>(11)</sup> našel vyšší počet získaných oocytů po aplikaci 150 IU hMG denně oproti 225 IU. K podobným výsledkům dospěl i Benadiva.<sup>(12)</sup> Jiní autoři však s úspěchem v této problematické skupině pacientek použili suprafyziologické dávky gonadotropinů. Po zvýšení dávky hMG ze 300 IU na 450 IU prokázal Hofmann signifikantně nižší procento přerušených cyklů a vyšší procento těhotenství.<sup>(71)</sup> Zavedení analog GnRH do stimulačních protokolů všeobecně snížilo procento přerušených cyklů a zvýšilo kvalitu a počet získaných oocytů.<sup>(153)</sup> Ve skupině normogonadotropních »poor responders« prokázal efektivitu agonistů GnRH Serafini.<sup>(168)</sup> Jiní autoři však varují před nadměrnou supresí (oversuppression) způsobenou protokoly využívajícími down regulaci s následným zhoršením odpovědi na stimulaci.<sup>(40,120)</sup> Naopak významně se uplatňuje stimulace využívající iniciální flare-up efekt analog. Tak např. Muasher popsal pouze 5 % přerušených cyklů a 21,3 % těhotenství po stimulaci poor-responders s využitím flare-up efektu agonistů GnRH.<sup>(120)</sup> Pro tuto problematickou skupinu žen bylo navrženo i současné použití (co-treatment) růstového hormonu, údajně zlepšující kvalitu ovariální stimulace poor responders. Následně provedené randomizované, dvojitě slepé a placebem kontrolované studie neprokázaly žádný pozitivní efekt této finančně mimořádně náročné stimulace.<sup>(13,73)</sup>

## 2.4. Asistovaný hatching

Abnormální průběh či nemožnost opuštění zona pellucida embryem (hatching) jsou považovány za jedny z možných příčin relativně stále nízké implantace po IVF.<sup>(24)</sup> Tento stav může být podmíněn abnormální konzistencí zóny (zona hardening) vzniklé při kultivaci<sup>(47)</sup> nebo jejím ztluštěním vzniklým během folikulogeneze nebo na základě embryonálních či děložních faktorů. Cohen publikoval údaje o vlivu tloušťky a charakteru zona pellucida na pravděpodobnost implantace, která byla 10 % u homogenních zón oproti 29 % u embryí s tenkými či nepravidelnými zónami.<sup>(25)</sup> Také vyšší procento implantovaných embryí po mikromanipulacích v oblasti zona pellucida v případech andrologické sterility podporuje tuto teorii.<sup>(236)</sup> Byly proto navrženy postupy k narušení integrity zona pellucida (asistovaný hatching), které mají embryu usnadnit opuštění zóny a následnou implantaci. Cohen svými výsledky dokazuje význam asistovaného hatchingu především u žen starších > 39 let (implantace 16 % vers. 3 %) a u žen se zvýšenými bazálními hladinami FSH (26 % vers. 10,5 %). Schoolcraft<sup>(162)</sup> a Stein<sup>(191)</sup> prokázali signifikantně lepší výsledky u žen > 39 let s opakovaným selháním implantace. Obruca<sup>(129)</sup> používal pro asistovaný hatching laser a srovnával 129 žen s opakovaným selháním implantace, u jejichž embryí byl proveden hatching, se 167 kontrolami. Procento implantace (implantation rate) bylo 14,4 % po asistovaném hatchingu oproti 6 % v kontrolním souboru a procento těhotenství 40 % vers. 16,2 %. Ne všichni autoři však jednoznačně prokazují pozitivní efekt asistovaného hatchingu. Hellebaut<sup>(69)</sup> ve své prospektivní randomizované studii neprokázal efekt asistovaného hatchingu: procento implantace bylo 17,9 % ve sledované skupině oproti 17,1 % v kontrolní skupině. Žádný rozdíl nenašla ani Mandelbaumová.<sup>(99)</sup> V současné době je zřejmá potřeba experimentálních studií k objasnění mechanismů a procesu hatchingu, které teprve přinesou racionální přístup k této problematice. Nelze učinit žádné definitivní závěry bez velkých klinických randomizovaných studií, které se vyjádří ke skutečné efektivitě a indikacím této metody.

### 2.4.1. Soubory a metodika

Přínos asistovaného hatchingu byl hodnocen na skupině 192 pacientek, u nichž byla mechanicky (pomocí dvou mikropipet) porušena integrita zona pellucida. Narušení zona pellucida provádíme na našem standardním mikromanipulačním zařízení (inverzní mikro-

skop Olympus s Hoffmanovým modulačním kontrastem a vyhřívacím stolkem, hydraulické mikromanipulátory Narishige). Pipety, jak fixační (holding), tak i operační, nepoužíváme komerční, ale vlastní výroby. Otvor v zona pellucida vytvoříme po přichycení embrya fixační mikropipetou průnikem operační mikropipety zónou bez porušení blastomer a poté mechanicky kontaktem s fixační pipetou. Ve sledovaném souboru bylo 79 žen ve věku  $\leq 34$  let a 113 pacientek ve věkové skupině  $\geq 35$  let. Asistovaný hatching byl prováděn 48 h po odběru oocytů nejčastěji na čtyřbuněčných embryích. Jako kontrolní skupina sloužilo 1493 žen, u kterých byl proveden přenos embryí bez předchozí mikromanipulace (asistovaného hatchingu). V kontrolním souboru bylo 1072 žen ve věkové skupině  $\leq 34$  let a 421 žen  $\geq 35$  let.

### 2.4.2. Výsledky

Z výsledků 1493 embryotransferů bez asistovaného hatchingu uvedených v tab. 1 jednoznačně vyplývá vliv věku na výsledky IVF, kdy ve skupině žen  $\geq 35$  let lze prokázat signifikantní pokles efektivity terapie oproti ženám mladším (16,6 % vers. 27,2 %).

Přínos asistovaného hatchingu se projevil v celém souboru pacientek – u skupiny žen ve věku  $\leq 34$  let vzrostla efektivita z 27 % na 38 %, u pacientek ve věku  $\geq 35$  let z 16,6 % na 20,3 % (tab. 2).

Tab. 1. Vliv věku na efektivitu IVF ve standardním IVF cyklu (bez asistovaného hatchingu)

Věk	Počet cyklů s transferem	Těhotenství (%)
$\leq 34$	1072	292 (27,2)
$\geq 35$	421	70 (16,6)



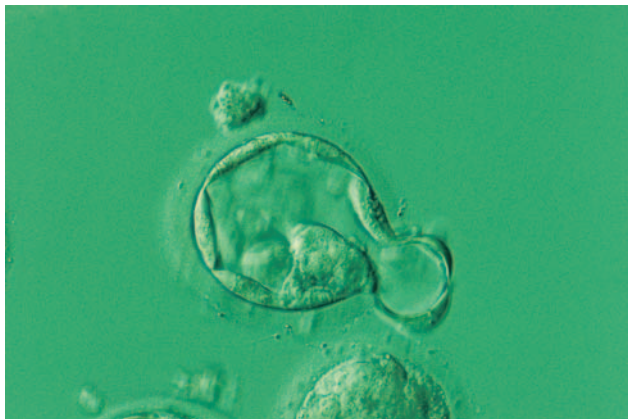
Obr. 1. Asistovaný hatching (1. fáze)



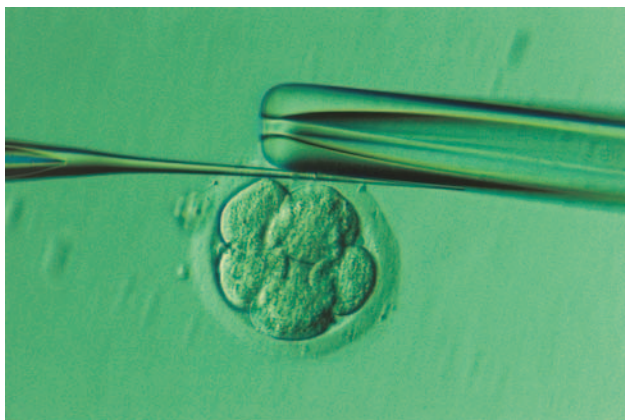
Tab. 2. Vliv asistovaného hatchingu na výsledky IVF v závislosti na věku

Věk	Počet cyklů s transferem	Těhotenství (%)
≤ 34	79	30 (38,0)
≥ 35	113	23 (20,3)

Uvedené výsledky jednoznačně dokazují, že patologické nálezy zona pellucida (zona thickening, zona hardening) u embryí po IVF jsou jednou z příčin ne stále ještě zcela uspokojivých výsledků. Narušení integrity zona pellucida, které vytváří embryu podmínky pro pozdější úspěšný hatching, zlepšuje výsledky IVF ve všech věkových skupinách a ne pouze u žen starších, jak se původně předpokládalo. Je však jedním z nástrojů, jak zvýšit efektivitu IVF v této obzvláště závažné skupině pacientek.



Obr. 2. Spontánní hatching blastocysty



Obr. 3. Asistovaný hatching (2. fáze)

## 2.5. Strategie při přenosu embryí

Počet přenášených embryí představuje stále diskutované téma. Se zvyšujícím se počtem přenášených embryí se do určité míry zvyšuje pravděpodobnost dosažení těhotenství,<sup>(42,128,187)</sup> současně se však zvyšuje riziko dvou- a vícečetného těhotenství.<sup>(187)</sup> Zejména výskyt troj- a vícečetných těhotenství je nežádoucí se zřetelem na alarmující perinatální výstupy a sociální a zdravotní rizika pro matku i děti.<sup>(166)</sup> Někteří autoři proto doporučují přenášet pouze dvě embrya, a tak eliminovat riziko vzniku troj- a vícečetného těhotenství.<sup>(128,188,223)</sup> Ačkoli tento postup signifikantně neovlivnil výsledky, ve dvou ze tří uvedených studií autoři uplatňovali věkový limit. Staessen<sup>(188)</sup> přenášel dvě embrya pouze tehdy, jednalo-li se o první IVF cyklus u ženy mladší než 37 let a obě embrya byla posouzena jako velmi kvalitní. Vauthier–Brouzes<sup>(223)</sup> aplikoval jako jedno z limitujících kritérií věk maximálně 35 let. Nijs<sup>(128)</sup> se sice ve své práci o věkovém limitu nezmiňuje, z jeho další práce však vyplývá, že i on uznává maximální věkovou hranici pro uvedený postup 35 let. Požadavek snížení počtu přenášených embryí je tedy nepochybně oprávněný, nelze však pominout nižší procento úspěšné implantace u starších žen. Věk proto představuje jedno ze závažných kritérií při rozhodování o počtu přenášených embryí.

### 2.5.1. Soubory a metodika

Při hodnocení vlivu počtu přenášených embryí na riziko vícečetné implantace jsme se vrátili k rozboru IVF cyklů z období před rokem 1992, kdy se přenášela prakticky všechna získaná embrya. Sledovali jsme výskyt vícečetné implantace ve 406 IVF cyklech po přenosu 1–6 embryí. Pravděpodobnost dosažení těhotenství v závislosti na počtu přenášených embryí jsme sledovali ve 435 IVF cyklech provedených po roce 1992, odkdy došlo k omezení maximálního počtu přenášených embryí na čtyři. Odpověď na otázku, zda selekce embryí ovlivňuje efektivitu, dává rozbor 126 cyklů s přenosem čtyř vybraných embryí (po selekci nejkvalitnějších embryí zbyla ještě embrya pro kryokonzervaci) a 103 cyklů s transferem všech čtyř získaných embryí bez možnosti selekce. V souvislosti s věkem jsme sledovali úspěšnost IVF po přenosu čtyř embryí u žen starších než 36 let.

## 2.5.2. Výsledky

Rozbor výsledků IVF v závislosti na počtu přenášených embryí potvrzuje známou skutečnost, že s počtem přenesených embryí se zvyšuje pravděpodobnost dosažení těhotenství. Od určitého počtu (čtyři) embryí se však již efektivita IVF nezvyšuje a pouze vzrůstá riziko vysoce mnohočetného těhotenství. Tuto skutečnost jednoznačně demonstrují tab. 3 a 4.

Tab. 3. Pravděpodobnost vícečetné implantace v závislosti na počtu přenášených embryí

Počet embryí při přenosu	Počet cyklů	Vícečetná implantace (%)
1	111	-
2	101	1 (10,0)
3	94	7 (38,9)
4	49	6 (46,2)
5	29	4 (36,4)
6	22	4 (44,4)

Tab. 4. Pravděpodobnost dosažení těhotenství v závislosti na počtu přenášených embryí

Počet embryí při ET	Počet cyklů	Klinická těhotenství	%
1	65	7	10,8
2	71	11	15,5
3	70	19	27,1
4	229	67	29,3
celkem	435	104	23,9

Výše uvedené výsledky nejsou zásadně ovlivněny skutečností, zda se jednalo o selektivní (vybraná čtyři nejkvalitnější embrya z většího počtu) nebo elektivní (transfer všech čtyř embryí, která po IVF vznikla) embryotransfer (tab. 5).

Tab. 5. Pravděpodobnost dosažení těhotenství při selektivním a elektivním přenosu čtyř embryí

	Čtyři embrya + kryo	Čtyři embrya
Počet cyklů	126	103
Klinické těhotenství (%)	39 (30,7)	28 (27,2)

Jak vyplývá z následující tabulky (tab. 6), výsledky mnohem více ovlivňuje věk pacientky. Po přenosu čtyř embryí u žen starších 36 let bylo dosaženo těhotenství pouze v 16,6 %, oproti 30,7 %, resp. 27,2 % v celém souboru.

Tab. 6. Pravděpodobnost dosažení těhotenství po přenosu čtyř embryí u žen starších 36 let

Počet cyklů	Klinická těhotenství (%)
42	7 (16,6)

Je zřejmé, že jedinou možností omezení počtu vícečetných těhotenství (jako komplikace asistované reprodukce s bezprostředním dopadem na perinatální výsledky) je snížení počtu transferovaných embryí. Z výše uváděných výsledků vyplývá, že je možné snížení maximálního počtu přenášených embryí ze čtyř na tři, aniž dojde ke snížení efektivity IVF. Tento přístup by se však neměl uplatňovat plošně u všech žen a měl by zohledňovat nižší fertilitu starších žen, u nichž jsou výsledky IVF signifikantně nižší, stejně jako riziko vícečetné implantace.

## 2.6. Dárcovství oocytů

Lutjen<sup>(95)</sup> jako první popsal těhotenství po přenosu embrya po fertilizaci darovaného oocytu a předpověděl rozvoj tohoto postupu při terapii žen s primárním ovariálním selháním. Postupem času byla indikace rozšířena i na případy žen nereagujících adekvátně na obvyklé stimulační protokoly a u ještě menstruuujících žen starších než 40 let.<sup>(169)</sup> Byly publikovány dokonce případy úspěšné aplikace tohoto postupu u menopauzálních žen.<sup>(9,160)</sup> O etických aspektech tohoto nepochybně kontroverzního postupu diskutovali mj. i Edwards<sup>(44)</sup> a Antinori.<sup>(8)</sup> Dárcovství oocytů představuje rozšíření terapeutických možností v souvislosti se sníženou fertilitou starších žen, představuje však naprosto samostatnou a svébytnou problematiku.

## 2.7. Závěry

- Věk je jedním z nejzávažnějších faktorů ovlivňujících výsledky léčby sterility metodami asistované reprodukce. Snížující se ovariální rezerva má za následek nedostatečnou odpověď na exogenní stimulaci gonadotropiny. I přes selekci nejkvalitnějších embryí pro transfer do dělohy je zřejmě kombinace oocytárního a uterinního faktoru příčinou poklesu efektivity terapie již u žen  $\geq 36$  let a tento pokles se dále zvyrazňuje u žen  $\geq 38$  let.

- Skryté ovariální selhání je častou příčinou nedostatečné reakce na ovariální stimulaci u žen v programu IVF. Vyšetření bazální hladiny FSH (3. den menstruačního cyklu) patří mezi základní vyšetření před zařazením do programu IVF, především u žen  $\geq 35$  let. Jediným racionálním postupem při hypergonadotropním stavu je terapie pomocí darovaných oocytů.
- Asistovaný hatching zvyšuje úspěšnost IVF u žen ve všech věkových kategoriích. Patologické stavy v oblasti zona pellucida jsou častou příčinou selhání implantace embryí v programu IVF.
- Efektivita našich postupů umožňuje snížit maximální počet přenášených embryí ze čtyř na tři, aniž dojde ke snížení efektivity léčby. Tento přístup by však měl být aplikován selektivně, ve věkové skupině žen  $\geq 36$  let je riziko vícečetné implantace malé.

### 3. VLIV OVARIÁLNÍ STIMULACE NA VÝSLEDKY IVF

Hormonální preparáty pro vyvolání ovulace u pacientek neovulujících nebo u žen s oligo- až amenoreou se v klinické praxi používají již více než 30 let. S nástupem mimotělního oplodnění začaly být tyto preparáty používány i u pravidelně ovulujících žen s normálním menstruačním cyklem.<sup>(49)</sup> Tento postup umožnil mnohem snazší monitorování sekrece LH, větší počet přenášených embryí zvýšil pravděpodobnost dosažení těhotenství a s rozvojem kryokonzervace výrazně vzrostl i počet těhotenství dosažených na punkci folikulů. Pro ovariální stimulaci se původně nejčastěji aplikoval klomifencitrát v kombinaci s hMG nebo hMG samotný. Významný přínos pro asistovanou reprodukci znamenalo zavedení stimulačních protokolů využívajících flare-up efekt či desenzitizaci a down-regulaci navozené působením analog GnRH.<sup>(51,145,171)</sup> Protokoly původně vypracované pro stimulaci »poor responders« či žen s opakovaně předčasnou sekrecí LH se ukázaly natolik efektivní,<sup>(96,97)</sup> že dnes představují metodu volby při hormonální přípravě před terapií metodami asistované reprodukce.

Stimulace kombinací klomifencitrátu a hMG znamenala ve své době značný přínos,<sup>(146)</sup> postupně se však začaly množit práce poukazující na negativní antiestrogenní vliv klomifencitrátu.<sup>(34,110,161,239)</sup> Tomuto působení nutno přičítat i námi nalezené vysoké procento přerušovaných IVF cyklů, značný počet mimoděložních těhotenství i vyšší úspěšnost při použití stimulačních protokolů využívajících analoga GnRH. Ke stejným závěrům došel i Abdalla, který po stimulaci CC/hMG popsal úspěšnost 11,9 % a 7,1 % těhotenství ukončených porodem, zatímco po stimulaci analogy GnRH a hMG v krátkém protokolu dosáhl 24,4 % těhotenství a 17,4 % gravidit ukončených porodem.<sup>(2)</sup>

Zásadní změnu nepřinesla ani stimulace samotnými menopauzálními gonadotropiny<sup>(57,154)</sup> či samotným FSH.<sup>(125,156)</sup> O tom, že při této stimulaci je nejhorší kontrola sekrece LH, svědčí nejen naše výsledky s extrémně vysokým procentem těhotenství ukončených potratem, ale např. i práce Dora.<sup>(37)</sup> Předčasnou luteinizaci našel v 9,4 % cyklů stimulovaných kombinací CC/hMG, ve 13,7 % cyklů stimulovaných samotným hMG a pouze ve 3,6 % cyklů po stimulaci analogy GnRH a hMG.

Kvalitativní změnu do ovariální stimulace přinesla analoga GnRH, přičemž míra kontroly sekrece LH určuje efektivitu stimulačního protokolu. Naše výsledky, jednoznačně prokazující převahu tzv. »dlouhého« stimulačního protokolu nad »krátkým« protokolem, jsou v soulase s nálezy ostatních autorů. Tak např. Tarlatzis dosáhl těhotenství v 19,4 % po stimulaci GnRH v krátkém protokolu oproti 25,8 % při dlouhém protokolu,<sup>(208)</sup> Antoine<sup>(10)</sup> uveřejnil téměř identická čísla (19,3 % vers. 25,3 %), stejně jako Tan.<sup>(203)</sup> Jednoznačným průkazem efektivity těchto stimulačních protokolů je metaanalytická studie Hughese, který uvádí signifikantně vyšší počet klinických těhotenství dosažených na stimulovaný cyklus i embryotransfer a naopak signifikantně nižší procento přerušovaných cyklů.<sup>(72)</sup>

Nevýhodou stimulace s analogy GnRH je častější výskyt závažného hyperstimulačního syndromu. Námi uváděná čísla zcela souhlasí s výskytem popsáním v literatuře.<sup>(52,118)</sup> Zdá se, že analoga GnRH zvyšují riziko hyperstimulačního syndromu mimo jiné i svým přímým působením na buňky granulózy.<sup>(118)</sup>

Za optimální stimulační protokol budoucnosti vedoucí k dalšímu zefektivnění mimotělního oplodnění lze zřejmě považovat aplikaci gonadotropinů nové generace (vysoce čištěný extrakční FSH – Metrodin HP a rekombinantní FSH – Gonal-F, Puregon) a jejich kombinací s antagonisty GnRH kontrolujícími sekreci LH. První zkušenosti s antagonisty tzv. třetí generace (Cetrorelix, Ganirelix) již byly uveřejněny.<sup>(36,56,132)</sup>

### 3.1. Soubory a metodika

Sledované soubory zahrnují pacientky stimulované kombinací klomifencitrátu a hMG, samotnými humánními gonadotropiny, analogy GnRH a hMG/FSH v tzv. »krátkém« protokolu a analogy GnRH a hMG/FSH v »dlouhém« protokolu.

Klomifencitrát (Gravosan) byl aplikován v denní dávce 100–150 mg (v závislosti na hmotnosti pacientky) od 3. do 7. dne cyklu, od 6. dne bylo započato s aplikací hMG (150 IU denně) až do dosažení adekvátní odpovědi, kdy byl aplikován hCG (Praedyn, Pregnyl) v dávce 10 000 j. i.m. Při stimulaci samotnými gonadotropiny (Pergonal, Metrodin, Pergogreen, Humegon, Menogon) byla započata stimulace 3. den cyklu a 150–225 IU hMG aplikováno až do dne, kdy dominantní folikul dosáhl velikosti 18 mm a byl aplikován hCG. Při stimulaci analogy GnRH a hMG/FSH v krátkém protokolu byla analoga GnRH (Suprefact nasal spray 800 µg denně) podávána od 2. dne menstruačního cyklu až do aplikace hCG. Od 3. dne menstruačního cyklu byl přidán hMG/FSH v dávce 150–225 IU denně. »Dlouhý«

protokol začínáme podáním depotního analogu GnRH (Decapeptyl depot 3,75 mg) na začátku menstruačního cyklu a po dosažení down regulace (za 14–21 dnů) začínáme s vlastní stimulací hMG/FSH.

### 3.2. Výsledky

Tab. 7 srovnává výsledky IVF u 246 žen stimulovaných kombinací CC-hMG se 142 cykly žen, které nereagovaly adekvátně na stimu-

Tab. 7. Výsledky IVF po stimulaci CC-hMG ve srovnání se stimulací GnRH analogy a hMG (krátký protokol) u low responders

Stimulace	CC-hMG	GnRH-a + hMG
Počet cyklů	246	142
Přerušené cykly (%)	61 (24,8)	23 (16,2)
Počet oocytů/pac.	5,6	5,1
Počet transferů (%)	158 (86,3)	94 (81,0)
Fertilizace %	58,2	63,1
Těhotenství/ET %	25,9	22,3

laci CC-hMG a byly proto stimulovány analogy GnRH a hMG v »krátkém« protokolu.

Nejllepší kontrolu nad stimulovaným cyklem poskytuje stimulace analogy GnRH a hMG/FSH v tzv. dlouhém protokolu. V tab. 9 srovnáváme na rozsáhlých souborech výsledky IVF po stimulaci kombinací CC-hMG, samotným hMG, analogy GnRH a hMG/FSH v krátkém a dlouhém protokolu.

Výsledky terapie vyjádřené počtem klinických těhotenství na transfer nevyovídají nic o dalším osudu dosažených těhotenství, který je

Tab. 8. Osud dosažených těhotenství v závislosti na stimulačním protokolu

Stimulace	CC-hMG	hMG	GnRHa/hMG (krátký cyklus)	GnRHa-hMG (dlouhý cyklus)
Pokračující gravidita %	69,7	50,0	73,5	85,5
Potrat %	22,7	44,4	22,1	9,7
GEU %	7,6	5,6	4,4	4,8

Tab. 9. Klinická těhotenství po IVF v závislosti na stimulačním protokolu

Stimulace	CC-hMG	hMG	GnRHa/hMG (krátký cyklus)	GnRHa-hMG (dlouhý cyklus)
Počet cyklů	326	132	792	383
Těhotné/ET %	21,5	21,2	23,7	32,7



také významně ovlivněn použitým stimulačním protokolem. Osud těhotenství v závislosti na stimulačním protokolu ukazuje tab. 8.

Za velmi dobré výsledky při stimulaci analogy GnRH a hMG/FSH v dlouhém protokolu však platíme častějším výskytem hyperstimulačního syndromu III. stupně – zatímco bez down regulace byla tato komplikace zaznamenána u 1,9 % stimulovaných žen, u pacientek s down regulací ve 3,4 %.

### 3.3. Závěry

- Výsledky naší práce jednoznačně potvrdily převahu stimulačních protokolů využívajících analoga GnRH nad stimulací pomocí kombinace klomifencitrátu a hMG či hMG samotným. Kromě vyššího procenta dosažených klinických těhotenství je zde i nejmenší procento mimoděložních těhotenství a nejvyšší procento těhotenství ukončených porodem (baby take-home rate).
- Práce potvrzuje skutečnost, že za kontrolu folikulogeneze je zodpovědný FSH, avšak osud dosažených těhotenství je podmíněn úrovní kontroly sekrece LH.
- Stimulace gonadotropiny je po předchozí down regulaci analogy GnRH nejen vysoce efektivní, ale též vysoce ekonomická s ohledem na náklady spojené s opakovanými IVF cykly.

## 4. VLIV ANDROLOGICKÉHO FAKTORU V ÉŘE INTRACYTOPLAZMATICKÉ INJEKCE SPERMIE (ICSI)

Vyšetření plodnosti muže spočívalo tradičně na vyčíslení počtu spermií v ejakulátu, popisu jejich morfologie a charakteru pohybu. V současné době vycházejí všechny laboratoře z materiálu WHO, který obsahuje standardní doporučení pro zpracování a hodnocení ejakulátu.<sup>(235)</sup> V případech závažné poruchy plodnosti muže byla až donedávna jediným možným řešením sterility inseminace s použitím spermií dárce. Mimetelní oplodnění oocyty nabídlo novou naději i doposud bezúspěšně léčeným párům, neboť umožnilo kontakt oocyty s dostatečným počtem spermií. Nicméně i přes sdělení o úspěšných těhotenstvích<sup>(240)</sup> zůstala efektivita standardní IVF metodiky při závažné oligospermii, astenospermii či teratospermii nízká. V těchto případech je při standardním IVF postupu procento fertilizace oocytů sníženo úměrně postižení reprodukčního potenciálu muže.<sup>(241)</sup> Zatímco u normospermických vzorků lze očekávat 70% fertilizaci preovulačních oocytů, při oligospermii < 10 mil./ml fertilizace klesá na 50 %, při oligospermii < 5 mil./ml na 20 % a méně.<sup>(242)</sup>

Výsledky v těchto závažných případech nesplynily očekávání, protože spermie nebyly schopny průniku skrze zona pellucida a spojení s oolemmou. Snaha o zvýšení procenta fertilizovaných oocytů proto nejprve vedla ke zvyšování počtu motilních spermií v inseminačním médiu a snižování celkového objemu inseminačního média. Další vývoj byl zaměřen na vypracování optimálních metod pro selekci maximálního počtu normálně utvářených a pohyblivých spermií. Největšího rozšíření dosáhla metoda swim-up a následně postupy využívající diskontinuální Percollové gradienty. Další možnost, jak zvýšit pravděpodobnost úspěšné interakce spermie-oocyt, představuje použití látek zvyšujících motilitu spermií (např. pentoxifylin), kultivace v tzv. mikrokapkách (microdroplets) či odstranění buněk cumulus oophorus obklopujících oocyt. Všechny tyto postupy přinesly zlepšení výsledků v případech středně závažné oligoastenospermie, nevedly však k zásadnímu obratu při závažně narušené spermioogenezi.

Jelikož parametry standardního vyšetření nativního ejakulátu jednoznačně nekorelují s funkční kompetencí spermií,<sup>(183)</sup> byla ve snaze zkvalitnit diagnostiku i terapii vypracována řada testů, které se snaží předvídat výsledek interakce gamet *in vitro*.<sup>(5)</sup> Mezi ně patří hypoosmotický test podle Jeyendrana,<sup>(75,78)</sup> hodnotící funkční integritu membrán spermatozoí, a tzv. zona-free hamster oocyte penetration assay podle Yanagimachiho,<sup>(237)</sup> hodnotící penetraci oocytů zlatých křečků zbavených zona pellucida vyšetřovanými spermii. Oba tyto testy hodnotí nepřímou kapacitaci a akrosomální reakci nezbytnou pro proces fertilizace. Tu je však možné posoudit i přímo<sup>(30)</sup> pomocí tzv. ARIC testu (acrosome reaction to ionophore challenge).  $\text{Ca}^{2+}$  ionofor označovaný jako A23187 generuje intracelulární signál pro  $\text{Ca}^{2+}$  vedoucí k sekvenci dějů kulminujících v akrosomální reakci.<sup>(6,76)</sup> Dalším z používaných testů je tzv. hemizona assay,<sup>(70,244)</sup> posuzující pro úspěšnou fertilizaci nezbytný proces vazby spermie na zona pellucida. Všechny tyto testy jsou však pro rutinní provoz komplikované a nákladné a jsou vyhrazeny pro vysoce specializované klinické laboratoře. Z praktického pohledu se jako velmi kvalitní kritérium ukázal počet získaných spermií použitelných pro IVF po laboratorní úpravě ejakulátu.<sup>(107)</sup>

Je-li významně snížen počet spermií, jejich motilita či vysoké procento vykazuje morfologické odchylky, je pravděpodobnost úspěšné penetrace zona pellucida velmi malá. Byly proto vypracovány postupy, jejichž cílem bylo usnadnit spermii průnik touto glykoproteinovou bariérou. Jako nevhodné řešení se ukázalo kompletní odstranění zona pellucida, neboť mělo za následek vznik polyspermie a narušení časného embryonálního vývoje, během kterého je pomocí zona pellucida embryo chráněno. Dále byly prováděny pokusy o změkčení zona pellucida (zona softening) pomocí enzymů (trypsin, pronáza) či jejího otevření (zona drilling) pomocí Tyrodova roztoku aplikovaného na omezený úsek zona pellucida pomocí mikropipety. Modifikací tohoto postupu bylo mechanické otevření zona pellucida nazvané Cohenem »parciální disekce zona pellucida« – PZD.<sup>(26)</sup> Arteficiální takto vzniklý otvor je 5–10x menší než otvor v zona pellucida po aplikaci Tyrodova roztoku, čímž se snížilo riziko polyspermie a poškození blastomer. Takto ošetřené oocyty v inseminačním médiu usnadňovaly spermii kontakt s oolemmou, úspěšná fertilizace však vyžadovala přítomnost progresivně pohyblivých, kapacitovaných spermií s normální akrosomální reakcí. Nevýhodou bylo neúnosně vysoké procento polyspermie při aplikaci normálně motilních spermií a naopak úplné selhání při aplikaci spermií s narušenou motilitou. Dalším krokem při rozvoji metod tzv. asistované fertilizace byla subzonální inseminace (SUZI), při které byly spermie aplikovány pomocí mikropipety do perivitellinního prostoru. Tento po-

stup dokázal zvýšit procento oplozených oocytů i v případech s narušenou pohyblivostí spermii. Přínos těchto postupů však zůstal stále omezený, protože pro úspěšnou interakci gamet byla stále rozhodující funkční integrita spermie (spermii) schopné normální akrosomální reakce.

Z výše uvedených důvodů se stala velmi atraktivní možností intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) umožňující intracytoplazmatickou aplikaci jediné spermie bez ohledu na její motilitu a stav akrosomu. Tento postup zcela obchází proces vazby spermie na oolemmu a její penetraci a před výše uvedenými metodami skýtá řadu předností, neboť řeší všechny abnormality složitého komplexního procesu interakce spermie-oocyt a průniku spermie vaječnými obaly. V animálním modelu popsal použití intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI) poprvé Lin v roce 1966.<sup>(91)</sup> V humánní medicíně je první zmínka o ICSI z roku 1988, vzhledem k vysokému počtu poškozených oocytů a k neúspěšné implantaci autoři v další práci nepokračovali.<sup>(85)</sup> Metodika byla následně rozpracována belgickou skupinou kolem Van Steirteghema a v roce 1992 byla publikována první 4 těhotenství po ICSI.<sup>(196)</sup> Potenciál tohoto postupu prokázala další práce výše uvedených autorů, kteří ve 300 cyklech provedli SUZI a ICSI: u 2214 oocytů byla aplikována SUZI a výsledkem bylo 18 % oplozených oocytů, zatímco po ICSI u 716 oocytů jich fertilizovalo 44 %.<sup>(195)</sup> Jednoznačnou dominanci ICSI nad SUZI potvrdili i ve své další práci z roku 1994, kdy hodnotili zkušenosti ze 600 cyklů.<sup>(194)</sup>

Srovnatelné výsledky publikoval následně Tsirigotis v roce 1994, když pomocí ICSI dosáhl 25 těhotenství u 69 párů.<sup>(221)</sup> Payne v další publikované studii referoval o fertilization rate po ICSI v 67 % a o dosažených 30 klinických graviditách ve 100 po sobě jdoucích IVF-ICSI léčebných cyklech.<sup>(143)</sup> V rámci této studie provedl prospektivní srovnání standardní IVF metodiky a ICSI: zatímco procento fertilizovaných oocytů po ICSI dosáhlo 67 %, pouze u 15 % oocytů po standardní IVF byla potvrzena normální fertilizace.

Netušené možnosti této techniky potvrdily i další a rozsáhlejší studie uveřejněné v roce 1995. Tucker léčil 92 neplodných párů v celkem 105 cyklech a dosáhl 28 klinických těhotenství (27 % na cyklus). V této studii prokázal i vliv věku na výsledky po ICSI: zatímco u žen do 36 let dosáhl těhotenství ve 40 %, z pacientek starších 36 let otěhotnělo pouze 14 %.<sup>(222)</sup> Palermo publikoval studii, ve které provedl ICSI u 227 párů se závažně narušenou spermiogenezí a dosáhl 84 těhotenství.<sup>(140)</sup> Porovnání výsledků po ICSI a po standardní IVF provedené u kontrolní skupiny 179 párů s čistě tubární sterilitou neprokázalo statisticky významné rozdíly: fertilizace po ICSI byla 59 % a po IVF 63 %, těhotenství po ICSI 37 % a po IVF 33 %.<sup>(3)</sup> Srovnatelný vývojový potenciál embryí po ICSI

a po standardní IVF prokázal i Staessen. Po elektivním transferu pouze dvou nejkvalitnějších embryí neprokázal statisticky významný rozdíl v úspěšnosti mezi embryi po ICSI a po IVF.<sup>(189)</sup>

## 4.1. Obstrukční azoospermie

### 4.1.1. Aspirace epididymálních spermií

Vrozená, získaná či iatrogenní (vazektomie) oboustranná obstrukce či atrézie vas deferens a/nebo epididymis vede k azoospermii. Mikrochirurgická rekanalizace může vést k úspěchu a obnovení fertility (zejména u mužů po vazektomii za účelem sterilizace), ne vždy je však chirurgický výkon úspěšný – zejména u pozánětlivých stavů a případů s vrozenou oboustrannou absencí vas deferens (CBAVD).

Až do nedávné doby panoval názor, že epididymální spermie nejsou »dostatečně zralé« pro normální fertilizaci oocyty. Zavedení mikrochirurgické aspirace epididymálních spermií (MESA) však jednoznačně prokázalo, že i tyto spermie mohou být použity k úspěšné fertilizaci. Aplikace epididymálních spermií ve standardním IVF programu vedla k těhotenstvím, avšak procenta fertilizace i těhotenství byla velmi nízká.<sup>(179)</sup>

V roce 1994 publikoval Silber práci srovnávající 67 cyklů s MESA a standardní IVF se 17 MESA cykly a ICSI. Fertilizace byla 7% po IVF a 45% po ICSI, těhotenství dosáhl v 5 % po IVF a ve 47 % po ICSI.<sup>(181)</sup> Podobně povzbudivé výsledky publikoval i Tournaye. U 12 párů, kdy se u muže jednalo o vrozenou oboustrannou aplazii vas deferens, dosáhl fertilizace u 58 % a těhotenství ve 36 %, vzhledem k vysokému počtu preklinických abortů bylo klinických těhotenství 21 %.<sup>(213)</sup> Vzhledem k vazbě CBAVD a cystické fibrózy je v těchto případech nutné genetické vyšetření obou partnerů a v případě prokázaného nosičství nutno modifikovat postup (dárcovské gamety) nebo využít metod preimplantační diagnostiky.

Vzhledem k invazivitě a náročnosti MESA je snaha tento výkon maximálně zjednodušit. Spermie získané při MESA lze kryokonzerovat: po použití rozmrazených spermií po MESA popsal Devroey fertilizaci ve 45 % a dvě úspěšná těhotenství.<sup>(33)</sup> Shrivastav v roce 1994 publikoval modifikaci spočívající v perkutánní aspiraci epididymálních spermií (PESA). Výkon je proveditelný v místní či celkové anestézii a i přes větší kontaminaci materiálu erytrocyty lze takto získané spermie použít pro ICSI a docílit těhotenství.<sup>(174)</sup> Při použití tohoto přístupu u 20 párů Craft třikrát nezískal spermie a musel výkon konvertovat na MESA, ve zbylých 16 případech docílil fertilizace ve 14 % a po transferu embryí i tří těhotenství.<sup>(29)</sup>

### 4.1.2. Extrakce testikulárních spermií

Logickým vyústěním zkušeností s MESA byl předpoklad, že lze-li úspěšně pracovat se spermii získanými z epididymis, lze použít i spermie získané přímo z testes (extrakce testikulárních spermií – TESE). První zkušenosti a úspěchy publikoval Schoysman,<sup>(176)</sup> následně Devroey docílil u tří párů fertilizaci po TESE a ICSI v 46 %, žádná pacientka však neotěhotněla.<sup>(32)</sup> Silber v práci publikované v roce 1995<sup>(180)</sup> srovnával výsledky u 28 párů, kdy v 16 případech použil MESA a ve 12 případech TESE. Výsledky v obou skupinách byly zcela identické (fertilizace 45 % po MESA, 46 % po TESE, těhotenství 50 % po MESA a 43 % po TESE). Konečně Tournaye publikoval studii a výsledky terapie 42 párů s obstrukční azoospermii u muže, kdy po TESE-ICSI docílil fertilizaci v 62 % a těhotenství na započatý cyklus ve 40 %.<sup>(213)</sup>

Stejně jako u MESA hledají se i pro TESE jednodušší přístupy nevyžadující otevřenou biopsii testikulární tkáně. Nagy prokázal, že pro ICSI lze použít i kryokonzervované testikulární spermie, procento fertilizace a cyklů s embryotransferem je však nižší než při použití »čerstvých« spermii.<sup>(121)</sup>

Možný je i perkutánní přístup, ačkoli materiál získaný perkutánní biopsií je méně kvalitní než při »otevřené« biopsii, i tyto spermie lze použít pro ICSI.

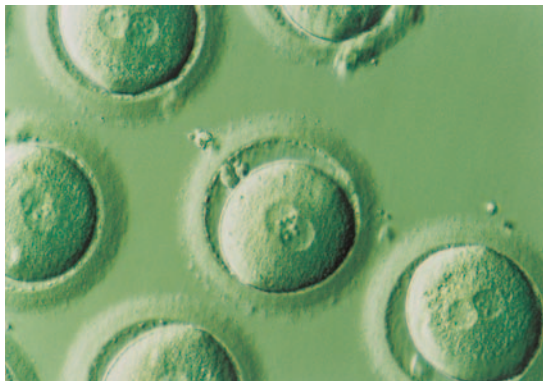
## 4.2. Mechanismy fertilizace oocyty po intracytoplazmatické injekci spermie

Již záhy po zavedení ICSI do klinické praxe bylo zřejmé, že ne všechny oocyty po aplikaci tohoto postupu fertilizují. Cytogenetické studie nefertilizovaných oocytů prokázaly, že u více než 90 % byla spermie úspěšně aplikována do cytoplazmy. Je tedy zřejmé, že v tomto případě se uplatňují jiné mechanismy. Ještě donedávna představovala aktivace oocyty po ICSI otevřený problém, neboť při ICSI je oocyt podroben řadě manipulací, z nichž teoreticky každá může vést k aktivaci oocyty. Existují dva hlavní faktory, které přicházejí v úvahu: buď je stejně jako v animálním modelu aktivace oocyty navozena vlastní mechanickou punkcí oocyty, nebo se uplatňuje faktor vnesený injikovanou spermii. Výzkumy sledující oscilace hladin kalcia a uvolnění kortikálních granulí po ICSI ukázaly, že oba výše zmíněné mechanismy jsou stejně pravděpodobné.<sup>(85,209,210)</sup> Pokusy Dozortseva na nefertilizovaných oocyttech však jednoznačně přinesly odpověď na tuto otázku. Fertilizace oocytů, u nichž provedl skutečnou ICSI, byla signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině,

kde provedl pouhou mechanickou penetrací oolemy s aspirací malého množství cystoplazmy jako při ICSI, avšak bez injekce spermie.<sup>(39)</sup> Tyto výsledky jednoznačně ukazují na význam injikované spermie při aktivaci oocyty.

Další práce prokázaly, že aktivace oocyty je vyvolána cytoplazmatickým faktorem vneseným spermii, který je termolabilní, druhově nespecifický a pouze intracelulárně účinný.<sup>(200)</sup> Ukazuje se tedy, že selhání fertilizace oocyty po ICSI je nejspíše podmíněno chyběním či selháním tohoto faktoru u zvolené spermie. Ve skutečnosti již bylo pomocí animálního modelu prokázáno několik případů deficience tohoto »sperm-associated oocyte-activating factor« označovaného zkratkou SAOAF.<sup>(157)</sup> V souhlase se zkušenostmi, že morfologické charakteristiky spermie neovlivňují výsledky ICSI, není ani působení SAOAF vázáno na morfologii vybrané spermie.<sup>(202)</sup> Aby se však tento faktor mohl uplatnit, musí být oocyt v odpovídajícím stupni zralosti. Nezralé oocyty nejsou aktivovány, a cílová struktura pro uplatnění SAOAF se tedy objevuje až po dosažení metafáze II. Nedávné pokusy prokázaly, že na rozdíl od myši vede intracytoplazmatická injekce kulatých spermatid u člověka k relativně vysokému procentu fertilizace, a je tedy zřejmé, že SAOAF se objevuje právě na tomto stupni spermatogeneze.

Při normálním procesu fertilizace dochází ke spojení cytoplazmy spermie a oocyty při fúzi membrán obou gamet. Při ICSI je celá spermie s intaktní membránou deponována do cytoplazmy oocyty, a je proto zřejmé, že uvolnění SAOAF musí předcházet porušení integrity membrány spermie. Doposud provedené pokusy naznačují, že cytoplazma oocyty neobsahuje faktor schopný narušit membránu spermie, a zdá se proto logické, že před vlastní ICSI by měla být membrána narušena. Bylo prokázáno, že při manipulaci a znehynění spermie před ICSI dochází k narušení integrity membrány spermie, které je nezbytné pro normální interakci spermie-oocyt včetně uvolnění SAOAF a které tak nahrazuje fúzi membrán



Obr. 4. Oplodzené oocyty ve stadiu prvojader

gamet při normální fertilizaci.<sup>(38)</sup> Na druhé straně polyvinylpyrrolidon (PVP), běžně užívaný v médiích při ICSI, stabilizuje membránu spermie a může negativně ovlivňovat fertilizaci narušením uvedeného mechanismu.<sup>(38)</sup>

Z výše uvedeného vyplývá, že při ICSI by spermie měly být vždy znehybněny narušením membrány bičíku, a to i tehdy, jsou-li nepohyblivé nebo s minimální pohyblivostí. Současně používaná koncentrace PVP v médiu by měla být co nejnižší, aby stabilizací membrány spermie nebylo narušeno uvolnění SAOAF a aktivace oocyty.

### **4.3. Klinické aspekty ICSI**

#### **4.3.1. Indukce ovulace**

Účelem ovariální stimulace před ICSI je stejně jako při použití jiných metod asistované reprodukce získat větší počet oocytů nejvyšší možné kvality, resp. optimální zralosti. Určitou specifitou stimulace před ICSI je snaha získat co největší počet oocytů, aby pro vlastní injekci spermie mohly být vybrány skutečně ty nejkvalitnější a aby – vzhledem k technické náročnosti – mohla být event. nadpočetná embrya kryokonzervována. Problematika stimulačních protokolů v programech AR byla opakovaně publikována. Pozornost je nutno věnovat i indikaci ICSI a výběru párů, neboť především věk výrazně negativně ovlivňuje folikulogenezi a implantaci. Gonadotropiny jsou aplikovány v maximálních dávkách, přičemž čistý FSH přináší o něco lepší výsledky než »klasické« gonadotropiny obsahující FSH:LH v poměru 1:1. Metodou volby jsou dnes jednoznačně stimulační protokoly s analogy GnRH, jejichž hlavní výhodou je potlačení předčasné sekrece LH, a tím i rizika předčasné ovulace nebo luteinizace folikulů in situ. Optimální stimulační schéma představuje tzv. dlouhý protokol, při jehož použití jsou hladiny LH ve folikulární fázi nižší než při stimulaci samotnými gonadotropiny nebo při stimulaci s analogy GnRH v tzv. krátkém protokolu. Vliv stimulačního protokolu na výsledky ICSI potvrzuje práce Greenblatta z roku 1995.<sup>(62)</sup>

#### **4.3.2. Andrologické a neandrologické indikace intracytoplazmatické injekce (ICSI)**

Mimotělní oplodnění otevřelo nové možnosti i pro ty páry, u kterých byla pro závažné narušení plodnosti muže až donedávna jediným



možným řešením sterility inseminace s použitím spermií dárce. Při použití standardní metodiky je však patrný výrazný pokles procenta fertilizovaných oocytů v závislosti na závažnosti postižení reprodukčního potenciálu muže.<sup>(241)</sup> Před nástupem intracytoplazmatické injekce (ICSI) bylo doporučeno nezařazovat do IVF ty páry, u nichž je počet spermií menší než 10 mil./ml, motilita < 30 % a zastoupení normálně utvářených spermií < 30 %. Pod tímto limitem byla naděje na dosažení těhotenství pouze 1 %.<sup>(81)</sup> Již v počátcích ICSI bylo zřejmé, že parametry klasického spermiogramu mají pouze minimální (pokud vůbec nějaký) vliv na výsledky této metody. Ve své časné studii z roku 1993 Palermo uvádí, že morfologie ovlivňuje výsledky SUZI a ICSI pouze okrajově.<sup>(140)</sup> Na druhé straně ovlivnění motility spermií aplikací pentoxifylinu nezlepšuje výsledky ICSI, naopak přítomnost stop pentoxifylinu může negativně ovlivnit procento fertilizace.

V roce 1995 práce tří nezávislých skupin a hodnocení celkem 1188 ICSI cyklů potvrdily, že klasické parametry spermiogramu (počet, motilita, morfologie) žádným způsobem neovlivňují výsledky ICSI. Nagy však jednoznačně demonstroval, že přítomnost alespoň několika – byť jakkoli pohyblivých – spermií je předpokladem úspěšné fertilizace po ICSI.<sup>(122)</sup>

Intracytoplazmatická injekce spermie dramaticky změnila přístup k andrologickému faktoru sterility a významně snížila potřebu darovaných spermií, přičemž použití epididymálních a testikulárních spermií (MESA, TESE) umožnilo dosáhnout těhotenství i v případech kompletní azoospermie.<sup>(179)</sup> Vysoká efektivita ICSI vedla některé autory k úvahám o rozvolnění indikací tohoto postupu, které vyústily až k diskusím o možné rutinní ICSI v IVF programu u všech pacientek.

#### 4.3.2.1. Soubory a metodika

Hodnotili jsme fertilizaci oocytů ve standardním programu IVF u párů se závažným andrologickým faktorem sterility (celkový počet spermií po laboratorní úpravě ejakulátu < 1 milión), kterou jsme srovnávali s fertilizací oocytů u ICSI z andrologické indikace. Soubory tvořilo 41 mužů, jejichž ejakulát byl upraven metodou swim-up, 57 mužů, u kterých byl použit Percoll, a 176 párů v ICSI programu, kde průměrný počet spermií po laboratorní úpravě byl v celém souboru 250 000. Podrobná metodika námi používaných postupů byla popsána v již dříve publikovaných sděleních.<sup>(107,105)</sup> Dosažené výsledky lze srovnat s dlouhodobým procentem fertilizace v našem IVF programu, které se pohybuje setrvale kolem 65 %.

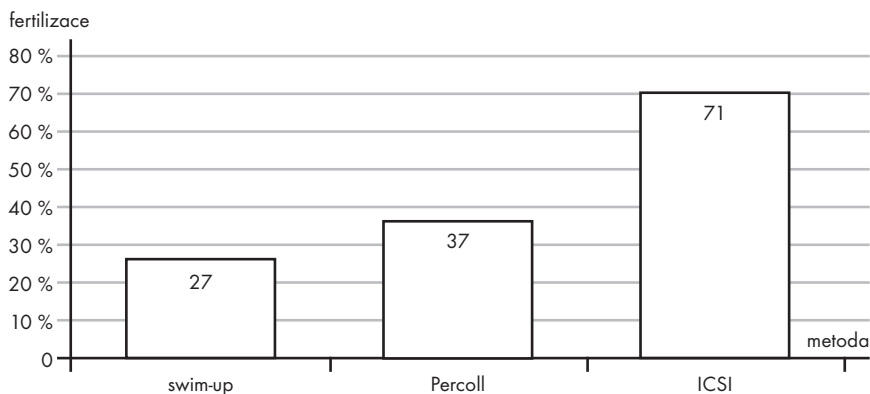
Z neandrologické indikace jsme prováděli ICSI u 12 párů s idiopatickým selháním fertilizace v předchozím IVF cyklu (po vyloučení »skrytého« andrologického faktoru a všech případů vysvětlitelných abnormálním průběhem hormonálních hladin a oocytárního faktoru) a při selhání fertilizace ve standardním IVF programu při imunologické sterilitě (13 párů).

#### 4.3.2.2. Výsledky

Při závažném andrologickém faktoru je použití percollového diskontinuálního gradientu šetrnější než standardní metodika swim-up a zvyšuje procento fertilizace (37 % vers. 27 %), které však zůstává stále neakceptovatelně nízké. Aplikací intracytoplazmatické injekce lze v těchto případech dosáhnout stejného nebo dokonce o něco vyššího procenta fertilizovaných oocytů (71 %), než je tomu v kontrolní skupině IVF pacientek, kde andrologický faktor není přítomen (65 %). Tyto výsledky zřetelně dokumentuje graf 11.

Aplikace ICSI při nevysvětlitelném selhání fertilizace ve standardním IVF programu umožňuje dosáhnout výsledků plně srovnatelných s kontrolním souborem. Výsledky u této skupiny žen jsou uvedeny v tab. 10.

Výsledky standardní IVF metodiky u párů s imunologickou sterilitou a význam ICSI u imunologické sterility s nízkou fertilizací či jejím selháním ukazuje tab. 11. Pozornost zaslouží zejména ty páry, u nichž ve 29 standardních IVF cyklech fertilizovalo pouze 14 ze 122 získaných oocytů a nedošlo k žádnému těhotenství. Po aplikaci ICSI se procento fertilizace zvýšilo na 51,9 % a dosáhli jsme 23,1 % klinických těhotenství.



Graf 11. Úspěšnost fertilizace při závažném andrologickém faktoru

Tab. 10. Výsledky ICSI u párů s idiopatickým selháním fertilizace ve standardním IVF programu

Léčba	Počet cyklů	Oocyty	Fertil. (%)	Deg. (%)	ET (%)	Embrya	Kryo (%)	Grav. (%)
IVF	12	111	2 (1,8)	-	2 (16,7)	2	-	-
ICSI	12	106	74 (69,8)	18 (16,7)	11 (91,7)	44	4 (33,3)	3 (25,0)

Tab. 11. Význam ICSI při imunologické sterilitě

Soubor	Počet cyklů	Fertilizace (%)	Těhotenství (%)
Standardní IVF	24	238/111 (46,6)	9 (37,5)
Selhání fertilizace (před ICSI)	29	122/14 (11,4)	0
ICSI u párů s předchozím selháním fertilizace	13	102/53 (51,9)	3 (23,1)

Na základě výše uvedených zkušeností a výsledků indikujeme intracytoplazmatickou injekci v následujících případech:

- andrologické indikace ICSI:
  - oligoastenoteratospermia gravis (ICSI s ejakulovanými spermii),
  - azoospermie - obstrukční (MESA, event. TESE);
  - neobstrukční (TESE);
- neandrologické indikace ICSI:
  - idiopatické selhání fertilizace při standardní IVF;
  - selhání fertilizace při standardní IVF u párů s imunologicky podmíněnou sterilitou.

Aplikace intracytoplazmatické injekce spermie znamenala skutečný převrat v přístupu k andrologicky podmíněné sterilitě<sup>(139)</sup> a ICSI vzhledem ke své vysoké efektivitě prakticky nahradila všechny starší terapeutické postupy.<sup>(196)</sup> Někteří autoři navrhovali použití ICSI rutinně pro fertilizaci všech oocytů v programu IVF v představě, že ICSI s kvalitními spermii ještě dále zvýší efektivitu této metody.<sup>(63)</sup> Sám Hamberger<sup>(63)</sup> však na základě vlastních výsledků uzavírá, že na současném stupni vývoje a poznání je použití ICSI oprávněné pouze v jasně indikovaných případech. Tento závěr jednoznačně podporuje i práce Aboulghara,<sup>(3)</sup> který aplikoval ICSI u 58 pacientek s čistě tubární sterilitou a dalších 58 žen s tubární sterilitou léčených standardní metodou IVF tvořilo kontrolní skupinu.

Ve skupině se standardní IVF dosáhl fertilizace oocytů v 64,8 % a 31 % klinických těhotenství na cyklus. Po ICSI fertilizovalo 70 % oocytů a úspěšnost byla 32,8 % klinických těhotenství. V žádném ze sledovaných parametrů nebyl mezi oběma skupinami prokázán statistický rozdíl. ICSI však bylo provedeno ze 748 získaných oocytů pouze u 572 oocytů v metafázi II, a tudíž fertilizace na získaný oocyt byla signifikantně vyšší po standardní IVF než po ICSI. Je

možné, že oocyty v metafázi I ponechané v programu standardní IVF v kultivaci mohou dosáhnout metafáze II a být oplozeny, zatímco v programu ICSI jsou vyřazovány.

Intracytoplazmatická injekce spermií je mimořádně cenná metoda představující kvalitativní přínos pro celou asistovanou reprodukci a andrologicky podmíněnou sterilitu především, má však jako jedna z metod buněčné chirurgie své definovatelné indikace, jež by měly být dodržovány.

### **4.3.3. Kryokonzervace embryí po ICSI**

Vysoká efektivita ICSI vedla záhy k nutnosti kryokonzervace »nadpočetných« embryí. Skupina kolem Van Steirteghema<sup>(193)</sup> porovnal výsledky kryokonzervace embryí po ICSI (1171 embryí zamrazeno, 413 rozmrazeno) a po standardní IVF (2495 zamrazeno, 969 rozmrazeno).

Výsledky byly naprosto srovnatelné jak počtem transferovaných embryí (52 % po ICSI, 51 % po IVF), tak pozitivitou  $\beta$ -hCG (22 % po ICSI, 15 % po IVF) i počtem klinických těhotenství (13 % po ICSI, 11 % po IVF). Pouze ve skupině po ICSI bylo zaznamenáno větší procento preklinických potratů (49 %) oproti standardní IVF (27 %).

### **4.3.4. Těhotenství po ICSI**

Od samého počátku použití této metodiky byla věnována mimořádná pozornost takto dosaženým těhotenstvím a sledování, zda není zvýšeno riziko vrozených vývojových vad. Bonduelle v roce 1994 publikovala výsledky vyšetření 55 dětí narozených po SUZI a ICSI, aniž prokázala jakékoli zvýšené riziko abnormalit. Stejná autorka v roce 1995 uveřejnila studii srovnávající výsledky vyšetření 130 dětí po ICSI a 130 dětí po standardní IVF. Ani v této práci nebylo prokázáno jakékoli riziko spojené s ICSI oproti normální populaci a dětem narozeným po standardní IVF. Poslední práce autorky hodnotí již 1160 dětí po ICSI. V závěru udává, že riziko porodu malformovaného plodu po ICSI je extrémně nízké. Vzhledem k samotnému mechanismu ICSI, který obchází přirozenou selekci spermií při procesu fertilizace, je obligátní vyšetření metodami prenatalní diagnostiky u těchto těhotenství plně indikováno a sledování takto počatých dětí musí dále pokračovat.

## 4.4. Genetické aspekty ICSI

Pomocí intracytoplazmatické injekce spermie lze dosáhnout ještě nedávno nepředstavitelně vysoké procento fertilizovaných oocytů. Touto metodikou se však obejdou přirozené mechanismy selekce spermie při fertilizaci a skutečná příčina sterility se tak dostává do pozadí.

Chromosomální aberace a abnormality představují častou příčinu andrologické sterility, přičemž incidence pozitivních nálezů stoupá v závislosti na stupni poruchy spermiogeneze.<sup>(108)</sup> Podle Nielsena lze při kompletní azoospermii očekávat chromosomální aberaci v 15,2 %, přičemž v 91,3 % se jednalo o poruchu gonosomů a v 8,7 % o poruchu autosomů. Nejčastějším nálezem aberace gonosomů byl karyotyp 47,XXY v 82,5 %. Ve skupině mužů s oligospermii pod 20 mil./ml byla incidence chromosomálních aberací 3,6 %, přičemž ve 21,1 % se podílely na poruše gonosomy a v 78,9 % autosomy. Při normospermii byla incidence chromosomálních poruch 0,7 %, na kterých se gonosomy podílely 14, 3 % a autosomy 85,7 %. Při poruše autosomů lze v 60 % očekávat numerickou odchylku a ve 40 % strukturální aberaci.<sup>(127)</sup>

Další možnou geneticky podmíněnou příčinou andrologické sterility jsou abnormality na úrovni DNA. Y-chromosom obsahuje asi 2 % všech lidských genů. Distální část krátkého raménka zaujímá tzv. pseudoautosomální oblast (PAR), jeho proximální část tzv. sex determinig region Y-chromosomu (SRY). Proximální část dlouhého raménka nese tzv. azoospermic factor (AZF) a jeho distální část tzv. heterochromatinovou oblast. Vogt ve své práci jasně ukázal, že narušení AZF vede k poruše spermiogeneze na různých stupních.<sup>(225)</sup> Předpokládá se, že u 5–20 % mužů s non-obstrukční azoospermii nebo těžkou oligospermii lze nalézt poruchu v AZF oblasti Y-chromosomu.

Velmi závažným stavem je andrologická sterilita v souvislosti s genem cystické fibrózy. Cystická fibróza (CF) je geneticky podmíněné onemocnění charakterizované abnormální sekrecí exokrinních žláz. Nejčastější klinickou manifestací představuje chronická obstrukční choroba bronchopulmonální a exokrinní insuficience pankreatu. Cystická fibróza je diagnostikována jednou na každých 2500 porodů u bílé rasy v Severní Americe a v Evropě, na každých 17 000 porodů u Afroameričanů a na 90 000 porodů asijské populace.<sup>(20)</sup> Všichni muži s CF mají oboustrannou vrozenou aplazii vas deferens (CBAVD), přičemž CBAVD je příčinou andrologické sterility asi v 1,4 % a při kompletní azoospermii v 6,1 %.<sup>(149,152)</sup> Gen pro cystickou fibrózu (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene – CFTR) je lokalizován na dlouhém raménku 7. chro-

mosomu a určuje syntézu proteinu sestávajícího ze 1480 aminokyselin, který je odpovědný za transport chloridových iontů přes membránu epitelových buněk. Většina mužů s CBAVD má testes normální velikosti a normální hodnoty FSH, LH a testosteronu.

## 4.5. Metodika ICSI

### 4.5.1. Příprava spermii

Cílem preparace spermii pro ICSI je získat alespoň takový počet vitálních spermii, aby bylo možno provést intracytoplazmatickou injekci spermie do všech získaných oocytů. Z několika možných způsobů preparace spermii pro ICSI nelze jednoznačně označit jediný, který by zaručoval optimální (nejvyšší) procento fertilizace. Navíc výsledek ICSI není jednoznačně závislý na zvoleném způsobu zpracování spermii, např. použitím pentoxifylinu lze zvýšit počet získaných pohyblivých spermii, z nichž i ty s horší kvalitou pohybu jsou živé, nesou haploidní genetickou informaci a splňují tak podmínky použitelnosti pro ICSI. Obecně řečeno, technika přípravy by měla být taková, aby při zpracování vzorků s extrémně nízkým počtem spermii byl získán co největší počet gamet, ale zároveň přitom nedošlo k porušení buněčné integrity. Zpracovávaný vzorek by proto neměl být centrifugován při více než 300 G a v mnoha případech se vzhledem k velmi malým počtům spermii nehodí ani často používaný swim-up. Ani percollový gradient nelze využít vždy, navíc je zde nutno promýt získané spermie od zbytků Percollu, aby se při ICSI nedostaly spolu se spermii do cytoplazmy oocytu.

### ■ Kombinovaná separace spermii

V naší laboratoři se osvědčila metoda separace spermii, při které jsou gamety nejprve centrifugovány v percollovém gradientu (40 %, 80 %, 200 g, 15 min) a poté promyty médiem (5 min, 200 g). Po odstranění supernatantu se peleta velmi opatrně převrství malým objemem média (2–3 mm vysoký sloupec) a spermie se při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> nechají vycestovávat přibližně 1 h. Jedná se vlastně o poněkud modifikovaný swim-up. Takto získané spermie jsou prostý všech příměsí (leukocytů, epitelii, event. mikrobiálního náplavu ap.), které se nepodařilo odstranit opakovanými centrifugacemi. Speciálně pro tento účel vytaženou úzkou Pasteurovou pipetou se odťáhne vrstvička média těsně nad peletkou a umístí se do předem připravené kapky PVP kryté parafinovým olejem. Tímto postupem

se sice zredukuje počet spermií, ale získáme živé, více či méně pohyblivé gamety, které jsou vhodné pro ICSI.

## ■ Příprava epididymálních a testikulárních spermií

Jestliže ejakulát neobsahuje žádné motilní spermie, je třeba přikročit k mikrochirurgické aspiraci obsahu epididymis (microsurgical epididymal sperm aspiration – MESA). Punktát, tj. roztok média a epididymálních komponent (spermie, často erytrocyty a další buňky, mikroorganismy), se podvrství pod parafinový olej a přidá se další kapka média (na okraj kapky punktátu). Ve standardních podmínkách (teplota 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>) se spermie nechají vycestovat na okraj kapky. Nejsou-li z epididymis získány žádné spermie, je třeba provést extrakci spermií přímo z testikulární tkáně (testicular sperm extraction – TESE). Identifikace a separace testikulárních spermií je složitá. Při TESE se odeberou semenotvorné kanálky, které v optimálním případě obsahují nejen na Sertoliho buňky vázané, ale i volné spermie. Po omytí velkým objemem média (odstranění krve po biopsii) a mechanickém otevření kanálků se jejich obsah dále rozpreparovává na malé kousky a pomocí mikropipety přenesse do kapek média a kultivuje pod parafinovým olejem cca 2 h ve standardních podmínkách. Je důležité, aby v kapce nebylo příliš mnoho buněk, protože by se velmi znesnadnil pohyb spermií. Během této doby získají některé spermie progresivní pohyb a migrují na periferii kapky. V některých případech se však spermie pohybují velmi špatně nebo se nepohybují vůbec. Takové spermie se potom aspirují z »kultivačních« kapek mikroinjekční pipetou přímo do PVP.

K problematice mikrochirurgického odběru spermií je třeba dodat dvě základní pravidla. Za prvé, pacient, který má podstoupit MESA, event. TESE, by měl vždy před vlastním operačním výkonem odevzdat do laboratoře ejakulát a k MESA či TESE je třeba přistoupit teprve tehdy, až je zcela jednoznačné, že z ejakulátu nelze získat žádné použitelné spermie. Za druhé – ani opakované testikulární biopsie nedávají vzhledem ke svému fokálnímu charakteru vyčerpávající informaci o reziduální spermatogenezi.

### 4.5.2. Příprava oocytů

Cumulus oophorus i corona radiata musejí být před ICSI kompletně odstraněny. Oocyto-kumulární komplex se bezprostředně po odběru krátce kultivuje (30 s) v roztoku média a hyaluronidázy (koncentrace 80 IU/ml). Enzymaticky narušené vaječné obaly se potom mechanicky odstraní opakovaným nasáváním do Pasteuro-

vy pipety o průměru téměř srovnatelném s velikostí oocyty (cca 150  $\mu\text{m}$ ). Protože lidské oocyty jsou rezistentní k většině partenogenetických aktivačních stimulů, je velmi nepravděpodobné, že by manipulace spojené s odstraňováním kumulárních a koronárních buněk vedly k předčasné indukci oocytární aktivity. Mechanická část odstraňování vaječných obalů se musí provádět dostatečně jemně, aby nedošlo k poškození zóny pellucida oocytů. Obaly je třeba odstranit zcela, protože zbytky corona radiata, které zůstanou přichyceny k zóně pellucida, by mohly deformovat oocyt, a tím narušit jeho další vývoj. Během denudace oocytů se kontroluje přítomnost 1. pólového tělíska, tj. dosažení metafáze II, a eventuální další abnormality v morfologii oocytů (nehomogenita cytoplazmy, tmavé oblasti v cytoplazmě nebo tmavá zóna pellucida či oolemma »bull's eye«, vakuoly ap.), jež by mohly negativně ovlivnit schopnost fertilizace a kvalitu embryí.

### 4.5.3. Příprava mikropipet

V současné době je již možné se rozhodnout, zda si bude pracoviště mikropipety pro mikromanipulace připravovat samo nebo je zakoupí již hotové. V naší laboratoři jsme dali přednost přípravě vlastních kapilár.

Mikroinjekční pipety vyrábíme z kapilár Drummond (Drummond Scientific Company, USA). Kapiláry opracováváme na přístrojích Narishige. Kapiláry nejprve umyjeme v ultrazvukové lázni a po opakovaném promytí redestilovanou vodou pečlivě vysušíme. Prvním krokem opracování kapiláry je její vytažení na »Micropipette Puller« PB-7. Následuje zbrúšení hrotu pomocí »Microgrinder« EG-40. Brousíme hroty se sklonem 40 stupňů a velikostí otvoru 7–10  $\mu\text{m}$ , abychom postihli eventuální morfoloické odlišnosti hlaviček spermií. Konečnou úpravou je tepelné opracování hrotu a ohnutí pipety na »Microforge« MF-90 (úhel cca 10°).

Ve vlastní laboratoři si připravujeme i fixační a denudační pipety. Kapiláry se umyjí stejně jako ty, ze kterých se zhotovují mikroinjekční pipety. Po vytažení se zalomí kolmo na podélnou osu a podle velikosti otvoru se rozdělí na fixační a denudační. Řez se potom více či méně opracuje teplem na »Microforge« a fixační pipety se zahnou (cca 10° vzhledem k podkladu).

### 4.5.4. Přístrojové vybavení pro mikromanipulace

Základem je vhodný inverzní mikroskop, v našem případě IX70 Olympus s Hoffmannovým modulačním kontrastem. Mikromani-



pulátory Narishige – MNN-1 (Three Dimensional Micromanipulator) a MMO-202D (Hanging Joystick Hydraulic Micromanipulator) jsou umístěny po obou stranách mikroskopu. Systém je doplněn na levé straně (embryologové pracující v laboratoři jsou praváci) »hrubším« mikroinjektorem IM-5B (Narishige), kterým se kontroluje podtlak fixační mikropipety. Na pravé straně je mikroinjektor IM-6 (Narishige) určený k injekcím spermií. Nepostradatelnou součástí tohoto komplexu je vyhřívaný stolek HT 200, který se po kompletaci stává součástí mikroskopu a zaručuje konstantní teplotu pracovního prostoru.

Pro zdárnou práci je velmi důležité sestavení celého systému, pečlivé naplnění mikroinjektorů minerálním olejem a odstranění všech vzduchových bublin.

#### **4.5.5. Mikromanipulace**

Všechny mikromanipulace se provádějí v kapkách média obsahujícího HEPES k udržení stálého pH i na vzduchu. Kapky jsou umístěny na vnitřní straně víčka Petriho misky a převrstveny parafinovým olejem vyhřátým na 37 °C. Spolu s kapkami jsou v misce i kapky polyvinilpyrolidonu (PVP), do nichž se přidá malý objem suspenze spermií. PVP umožňuje díky své vysoké viskozitě velmi dobrou kontrolu pohybu spermie a posléze cytoplazmy v mikroinjekční pipetě a selekci vhodné spermie.

Rychlost vlastního provedení závisí na zkušenosti a manuální zručnosti embryologa, na kvalitě spermií a na eventuálním obsahu detritu či jiného znečištění suspenze PVP a spermií. Obtížné bývá provedení ICSI především po MESA či TESE.

#### **■ Selektce spermií**

Pro rozhodnutí, kterou spermii injikovat, je důležité zohlednit původ spermie. U ejakulovaných spermií je výhodnější aplikovat raději morfologicky poněkud odlišnou spermii než spermii zcela nepohyblivou, u které lze jen velmi těžko určit, zda již není mrtvá. Spermie získané při MESA či TESE jsou však velmi často nepohyblivé z důvodu nezralosti, a není-li jiná možnost, mohou být injikovány.

Ve spojitosti s ICSI však stále zůstává otevřená otázka výběru »optimální« a »geneticky zdravé« spermie. Vzhledem k tomu, že zatím neexistuje možnost selektce »zdravé« spermie podle její morfologie či pohybu, je injikována taková spermie, která se všemi parametry nejvíce přibližuje normě.

## ■ Příprava spermie před injekcí

Vybraná vhodná spermie se mechanicky imobilizuje opakovanými dotyky injekční jehly na střední část bičíku. Tento dotyk stačí k částečnému poškození plazmatické membrány spermie, které je podstatné pro dekonduzaci jádra spermie v oocytu a také vede k uvolnění SAOAF (sperm-associated oocyte activating factor), látky zodpovědné za aktivaci oocytu po průniku spermie do jeho cytoplazmy. Mechanické zhmoždění bičíku spermie je nutné i u zcela nepohyblivých spermií. Takto připravená spermie se potom aspiruje bičíkem napřed do injekční pipety. Několikerým opakovaným posunem spermie v pipetě se ověří, že se nepřilepila na její vnitřní stěnu. Poté se injekční pipeta přesune do kapky média s již předem denudovaným a zkontrolovaným oocytem. Zde se oocyt pomocí fixační pipety zachytí tak, že pólové tělíčko je v postavení »12« nebo »6«. Injekční pipeta se potom umístí přesně proti fixační pipetě (v poloze »3«) a posunem nahoru či dolů je dosažena rovina. Jedině toto uspořádání umožňuje řádnou injekci spermie bez porušení dělicího vřeténka oocytu.

## ■ Injekce spermie

Po dotyku zona pellucida injekční pipetou je spermie posunuta těsně k okraji injekční pipety. Tím se minimalizuje objem PVP, který se dostane do oocytu. Mikroinjekční pipeta se potom pomalu a opatrně vsune dostatečně hluboko do oocytu při současném vchlípení vitelinní membrány dovnitř. Opatrným nasátím cytoplazmy do pipety je verifikována penetrace membrány, a tím se zaručí, že po vypuzení spermie z pipety se tato dostane skutečně do nitra oocytu a nikoli pouze do perivitelinního prostoru. Obě operace, tj. aspirace i zpětná injekce cytoplazmy a spermie, se musí provádět dostatečně jemně, aby nedošlo k závažnému poškození oocytu, které by vedlo k jeho degeneraci nebo abnormálnímu vývoji. Injikované oocyty se po opakovaném promytí od manipulačního média dále kultivují ve standardních podmínkách obvyklých v naší laboratoři.

### 4.5.6. Kontrola oplození

Na základě známých faktů můžeme říci, že další vývoj oocytů po ICSI je shodný s vývojem ostatních oocytů v IVF programu. Oplození (tj. přítomnost prvojader a druhého pólového tělíčka) se hodnotí cca 16–18 h po ICSI. Dále se kultivují a posléze transferují jen oocyty řádně oplozené.

## 4.6. Výsledky

Intracytoplazmatická injekce spermií je mimořádně složitý postup vyžadující nejen zručnost a rutinu embryologa při vlastním výkonu, ale i nezbytné technické »know-how« jak při přípravě gamet před ICSI, tak i při technické přípravě vlastního mikromanipulátoru a mikropipet a v neposlední řadě i optimální materiálové vybavení (inverzní mikroskop s Hoffmannovým modulačním kontrastem, mikromanipulátory Narishige s joystiky). Výsledky dosažené v naší laboratoři dokumentuje tab. 12.

Nelze-li získat z ejakulátu žádné spermie ani pro ICSI (kompletní azoospermie), lze přistoupit k mikrochirurgickému odběru epididymálních spermií (MESA), event. při neúspěchu pokračovat extrakcí spermií přímo z rete testis po bioptickém odběru (TESE).

Tab. 13 ukazuje sumární výsledky s použitím epididymálních a testikulárních spermií, v tab. 14 a 15 jsou samostatně uvedeny výsledky pro epididymální a testikulární spermie.

MESA a TESE jsme indikovali při nálezů kompletní azoospermie v ejakulátu. Při práci s ejakulovanými spermii byl po laboratorní úpravě průměrný celkový počet spermií, které byly k dispozici pro ICSI, 250 000 (0,25 mil.).

Od roku 1994 jsme jako první v České republice zavedli systém tzv. transportní IVF. Stimulaci ovarií a odběr oocytů provádí spolu-

Tab. 12. Výsledky ICSI v období 1. 1.-31. 12. 1996

Počet pac.	Oocyty	Fertil. (%)	Deg. (%)	ET (%)	Embrya	Kryo (%)	Grav. (%)
174	1358	966 (71,1)	161 (11,8)	162 (93,1)	585	43 (24,7)	40 (24,7)

Tab. 13. Výsledky ICSI s použitím epididymálních a testikulárních spermií (MESA,

Počet pac.	Oocyty	Fertil. (%)	Deg. (%)	ET (%)	Embrya	Kryo (%)	Grav. (%)
12	132	58 (43,9)	13 (9,3)	9 (75)	36	3 (25)	3 (33,3)

Tab. 14. Výsledky ICSI s použitím epididymálních spermií (MESA)

Počet pac.	Oocyty	Fertil. (%)	Deg. (%)	ET (%)	Embrya	Kryo (%)	Grav. (%)
7	75	51 (68)	8 (10,7)	6 (85,7)	24	2 (28,6)	2 (33,3)

Tab. 15. Výsledky ICSI s použitím testikulárních spermií (TESE)

Počet pac.	Oocyty	Fertil. (%)	Deg. (%)	ET (%)	Embrya	Kryo (%)	Grav. (%)
5	56	18 (32,1)	5 (8,9)	3 (60)*	12	1 (20)	1 (33,3)

\*1) U dvou pacientek z pěti nebyly v bioptickém materiálu nalezeny žádné spermie, u všech tří zbylých pacientek byla získána embrya a proveden embryotransfer.

pracující gynekologické pracoviště, získané folikulární tekutiny jsou potom transportovány do centrální IVF laboratoře, kde jsou identifikovány jednotlivé oocyty a kde probíhá laboratorní fáze léčby a transfer embryí do dělohy. Smyslem tohoto uspořádání IVF programu je zainteresovat více lékařů do celého léčebného procesu, přiblížit celou »high-tech« terapii pracovišti a lékaři, na kterého je pacientka zvyklá, a přitom racionálně koncentrovat náročné materiálové vybavení, zkušenosti a embryologické »know-how« tak, aby pacientům byly zaručeny optimální výsledky a dostupnost poskytované péče, plátcí potom maximálně racionální využití poskytovaných finančních prostředků.

Vzhledem ke stále narůstajícímu počtu neplodných párů z důvodu snížené plodnosti muže jsme přistoupili i k provádění ICSI u oocytů z transportního programu. Výsledky 46 transportních IVF-ICSI cyklů jsou uvedeny v tab. 16.

U párů v transportním ICSI programu, kdy intracytoplazmatickou injekci indikoval odesílající lékař a tato indikace byla respektována, byl po laboratorní úpravě průměrný celkový počet spermií, které byly k dispozici pro ICSI, 2 080 000 (2,08 mil.).

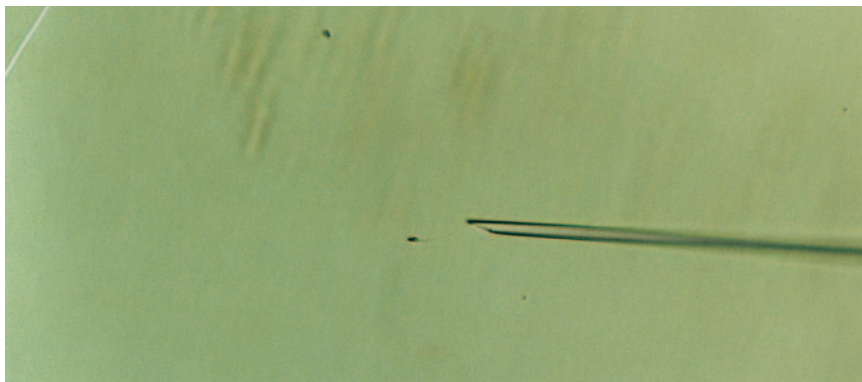
V roce 1996 bylo v programu IVF oplozeno 58,1 % všech získaných oocytů a efektivita terapie vykazovala 24,1 % klinických těhotenství na cyklus s transferem alespoň jednoho embrya. Při ICSI bylo téměř ve všech sledovaných kategoriích dosaženo vyššího procenta fertilizace než ve standardním IVF programu, což v souvislosti se závažností ošetřovaných případů (donesávna terapeuticky zcela nepřístupných) nepochybně svědčí o mimořádných možnostech, které tato metodika nabízí. Na druhé straně se na tomto faktu nepochybně podílí i to, že metodika ICSI umožňuje dokonale posoudit kvalitu ošetřovaných oocytů a abnormální oocyty jsou z programu vyřazeny. Jedinou skupinou, kde je procento fertilizace významně nižší oproti kontrolní skupině párů ve standardním IVF programu, jsou nejzávažnější případy andrologické sterility, u kterých je nutno ICSI provádět se spermii získanými z testikulární tkáně. Pokud se však podaří tímto způsobem spermie získat a připravit je pro ICSI, lze i zde v naprosté většině případů očekávat, že bude proveden embryotransfer s velmi dobrou nadějí na dosažení těhotenství. Jelikož partnerky těchto mužů jsou většinou gynekologicky bez jakýchkoli problémů a jejich plodnost není narušena, kompenzuje zřejmě tato skutečnost handicap náročného terapeutického postupu a vyhlídky na úspěch jsou velmi dobré.

Tab. 16. Výsledky ICSI v transportním programu

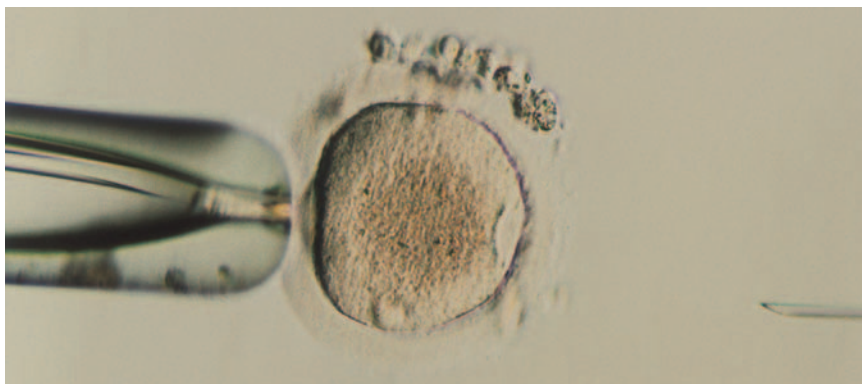
Počet pac.	Oocyty	Fertil. (%)	Deg. (%)	ET (%)	Embrya	Kryo (%)	Grav. (%)
46	360	260 (72,2)	37 (10,3)	45 (97,8)	162	15 (32,6)	9 (19,5)

Jak jsme již dříve prokázali v programu transportní IVF, ani déle trvající převoz oocytů při adekvátním zacházení neovlivňuje dosahované výsledky. Není proto překvapením, že i výsledky ICSI (fertilizace 72,2 %, embryotransfer v 97,8 % cyklů, kryokonzervace nadpočetných embryí ve 32,6 % cyklů) jsou v této skupině srovnatelné s výsledky těch párů, jejichž oocyty byly bezprostředně ošetřeny v naší embryologické laboratoři. O něco nižší procento dosažených těhotenství (19,5 %/ET) lze zřejmě vysvětlit tím, že průměrné parametry spermioqramu byly u těchto párů signifikantně lepší a že se zřejmě ve vyšším procentu na sterilitě páru spoluúčastnil i jiný (gynekologický) faktor, který negativně ovlivňoval implantaci přenesených embryí.

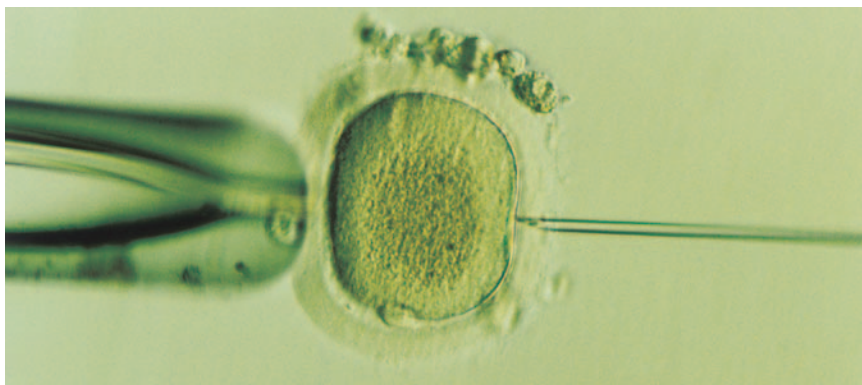
Intracytoplazmatická injekce spermie umožňuje dosáhnout standardně vysokého procenta fertilizace i u těch párů, u kterých na základě poruchy interakce gamet nedochází opakovaně k oplození oocytů ani v kontrolovaných podmínkách embryologické laboratoře



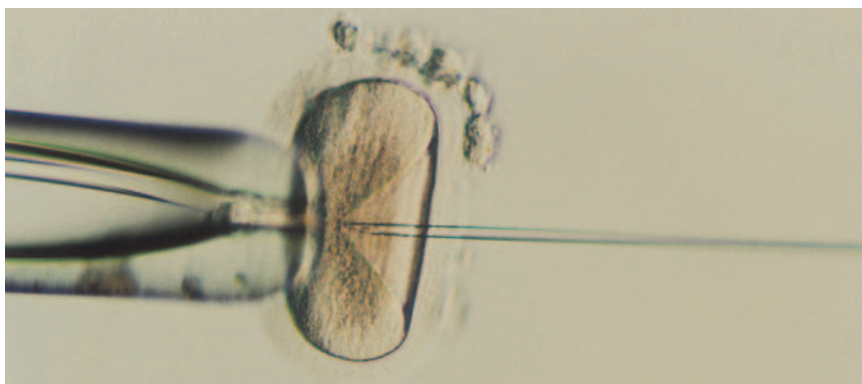
Obr. 5. Aspirace spermie do mikropipety před ICSI



Obr. 6. Fixace oocytu »holding« mikropipetou před ICSI, pólové tělísko u č. 6



Obr. 7. Hrot injekční mikropipety těsně před průnikem do cytoplazmy oocyty



Obr. 8. Deformace pružné oolemy před průnikem hrotu mikropipety do cytoplazmy



Obr. 9. Injekce spermie do ooplazmy

(ať je příčina této poruchy imunologického původu nebo našimi dnešními vyšetřovacími metodami zatím nezjistitelná). Navíc je zřejmé, že dojde-li k fertilizaci a přenosu embryí, vlastní implantace již není narušena a lze očekávat výsledky nejméně tak dobré, jako v kontrolním souboru.

Dostupná literatura a souborné zkušenosti renomovaných pracovišť neprokázaly zvýšené riziko vrozených vývojových vad či jiných abnormalit u takto počatých dětí. Přesto u všech našich těhotných po ICSI indikujeme vyšetření metodami prenatální diagnostiky a doposud jsme nezaznamenali ani jeden záchyt abnormálního karyotypu plodu.

## 4.7. Závěry

- Díky rozvoji metod asistované reprodukce dnes patří nedávno ještě prakticky neléčitelné stavy andrologické sterility mezi případy s mimořádně dobrými vyhlídkami na úspěch terapie.
- Intracytoplazmatická injekce spermií překročila problematiku nejasné etiopatogeneze a neúspěšné kauzální terapie. Další rozvoj andrologie však vyžaduje návrat k této problematice.
- Azoospermie již není jasnou indikací pro použití spermií dárce. Aspirace epididymálních spermií či extrakce testikulárních spermií dává stejnou naději na těhotenství jako ICSI s použitím ejakulovaných spermií. Ani vysoká efektivita ICSI by však neměla být příčinou menší snahy o exaktní stanovení příčiny azoospermie, především se zřetelem na genetické aspekty. Navíc případy obstrukční azoospermie mají mnohem vyšší naději na úspěch než neobstrukční, a diagnóza je proto důležitá pro rozhodování o dalším postupu terapie.
- Standardní úspěšnost transportního IVF programu se potvrdila i v transportním IVF-ICSI programu. Samotný transport gamet neovlivňuje dosažené výsledky, kritickými se pro výsledky transportního ICSI programu zdají další (gynekologické) faktory sterility.
- Kromě nejzávažnějších případů andrologicky podmíněné sterility páru existují i neandrologické indikace ICSI. Je to opakované idiopatické selhání fertilizace oocytů ve standardním programu IVF a dále selhání fertilizace při prokázané imunologické příčině sterility.
- Intracytoplazmatická injekce spermií je postup, který významně eliminuje nutnost použití spermií dárce při andrologicky podmíněné sterilitě a téměř všem postiženým párům dává naději dosáhnout těhotenství a porodu geneticky vlastního dítěte.

## 5. SELEKCE EMBRYÍ PRO TRANSFER (PRODLOUŽENÁ KULTIVACE EMBRYÍ)

I přes rozsáhlý výzkum poskytují běžná komerční média suboptimální podmínky pro vývoj embryí projevující se jejich pomalejším růstem *in vitro* než *in vivo*.<sup>(21,66)</sup> Při použití různých přísně kontrolovaných médií pouze 17–25 % »nadpočetných« embryí dosáhlo po pětidenní kultivaci stadia blastocysty.<sup>(14,46)</sup> Naproti tomu po 48hodinové kultivaci dosáhne 60–70 % inseminovaných oocytů stadia 4–6 buněčného embrya a při jejich přenosu v tomto stadiu je dosaženo těhotenství v 15–20 %.<sup>(226)</sup> Při fertilizaci *in vivo* se embryo transportuje do dělohy ve stadiu kavituující blastocysty čtvrtý až pátý den po fertilizaci. Embrya transferovaná do dělohy za obvyklých 48 h po inseminaci se dostávají do děložní dutiny minimálně o dva dny dříve a mohou degenerovat ještě před implantací. K selhání implantace může přispívat i chybění časných embryonálních signálů. Za hlavní příčinu se však považuje nedostatek kritických růstových faktorů produkovaných za normálních okolností buňkami reprodukčního ústrojí nebo jejich přílišné naředění v kultivačním médiu, jsou-li produkovány samotnými embryi. Těmito mechanismy pak mohou autokrinní a parakrinní faktory regulovat vývoj a diferenciaci preimplantačního embrya.

Kontrola růstu a diferenciaci savčí embryogeneze je regulována růstovými faktory embryonálního či mateřského původu. Řada autorů prokázala při použití odlišných technik produkci růstových faktorů savčími embryi.<sup>(142,232)</sup> Naproti tomu přidání růstových faktorů do chemicky přesně definovaných médií urychlilo růst myších embryí i zrání a fertilizaci myších oocytů *in vitro*.<sup>(22,31)</sup>

Důkazem významu růstových faktorů pro vývoj embrya je průkaz specifických receptorů na kultivovaných embryích. Inzulínové receptory se objevují po dosažení osmibuněčného stadia současně s přechodem z pyruvátu na glukózu jako hlavní zdroj energie buněčného metabolismu.<sup>(109)</sup>

Jednou z možností, jak optimalizovat kultivační prostředí, je použití podpurných buněčných systémů (kokultivace). Tyto pomocné buňky buď uvolňují do prostředí růstové faktory, a/nebo ab-



sorbují toxiny negativně ovlivňující embryonální vývoj. Výsledky léčby sterility při tubárních transferech ať již gamet (GIFT) či embryí (TET) jsou podle údajů řady pracovišť lepší než výsledky klasické IVF s uterinním transferem embryí.<sup>(111)</sup> Jedním z možných vysvětlení je krátká doba pobytu preembryí v arteficiálním prostředí kultivačních médií a jejich časný transfer do vejcovodů. Současně embryotrofské faktory přítomné v tubární tekutině podporují jejich vývoj a růst. Kokultivace embryí se tedy snaží napodobit podmínky, které má embryo ve fyziologickém prostředí.<sup>(18)</sup>

Bongso používal pro kokultivace lidské ampulární buňky a prokázal morfologicky kvalitnější embrya a častější vývoj až do stadia blastocysty.<sup>(18)</sup> Při použití kokultivačních systémů prokázal lepší výsledky oproti standardní kultivaci jak při IVF, tak při TET.

Kromě ampulárních buněk se používají i jiné buněčné linie,<sup>(18, 114, 224, 232)</sup> avšak bez ohledu na jejich původ je kvalita takto kultivovaných embryí vždy vyšší oproti standardní kultivaci v samotném médiu. Je zřejmé, že efekt kokultivačních systémů není ani druhové, ani tkáňově specifický. Menezo pracuje s Vero buňkami (stabilizovaná heteroploidní tkáňová kultura z ledvin kočkodana) a publikoval častější vývoj embryí až do stadia blastocysty.<sup>(114)</sup>

Mechanismy pozitivního efektu kokultivací nejsou doposud jednoznačně objasněny. V literatuře se diskutují především dva možné způsoby:

- do média jsou vylučovány specifické či nespecifické růstové faktory;
- buňky podpůrné tkáňové kultury odstraňují z média látky negativně ovlivňující embryonální vývoj.

U řady živočišných druhů včetně člověka byla dokumentována zástava růstu *in vitro* kultivovaných embryí v době aktivace embryonálního genomu. Kokultivační systémy pomáhají většině savčích embryí toto kritické stadium překlenout, resp. umožňují selekci normálně se vyvíjejících embryí.

Povzbudivé výsledky při aplikaci kokultivací naznačují, že růstové faktory produkované buňkami reprodukčního ústrojí mohou mít velmi důležitou úlohu při vývoji a diferenciaci embrya. Proloužení doby kultivace navíc umožňuje lépe napodobit přirozené mechanismy, a tak snižuje nebezpečí asynchronie mezi vývojem embrya a endometriem.

Metodika kokultivací má však i své nevýhody a možná rizika. Mezi nevýhody patří především časová a finanční náročnost a riziko neuskutečnění embryotransferu z důvodu zástavy růstu všech embryí. Hlavní námitkou při použití kokultivací jsou však obavy z kontaminace embrya prostřednictvím buněk podpůrného monolayeru. Existuje sice práce dokazující, že zona pellucida působí jako ochranná bariéra před infekcí baktériemi, plísněmi a většími

viry,<sup>(41)</sup> avšak pouze některé buněčné linie jsou považovány za prokazatelně bezpečné – jedná se zejména o Vero buňky. Použití jiných zvířecích i lidských buněčných linií se považuje za potenciálně rizikové. Dalším problémem je udržování čisté plnohodnotné a nekontaminované buněčné linie během pasážování, řešením jsou tkáňové kultury udržované co nejkratší dobu.

Velmi lákavou alternativou, umožňující dlouhodobou kultivaci embryí stejně jako kokultivace, jsou v poslední době nová komplexní média, např. médium M3 (složené z médií Ham F10 a F12 se syntetickým sérem SSR2) od firmy Medicult nebo HATCH-50 firmy Scandinavian IVF Science AB. Tak např. Forsdahl docílil u neselektovaných skupin pacientek po transferu maximálně dvou morul (po 96 h kultivaci) nebo dvou blastocyst (po 120 h kultivace) 62 %, resp. 52 % klinických těhotenství na embryotransfer.<sup>(53)</sup> Huisman kombinoval Earlovo médium a Ham F10 a docílil 50 % těhotenství po přenosu blastocyst po 120 h kultivace.<sup>(74)</sup>

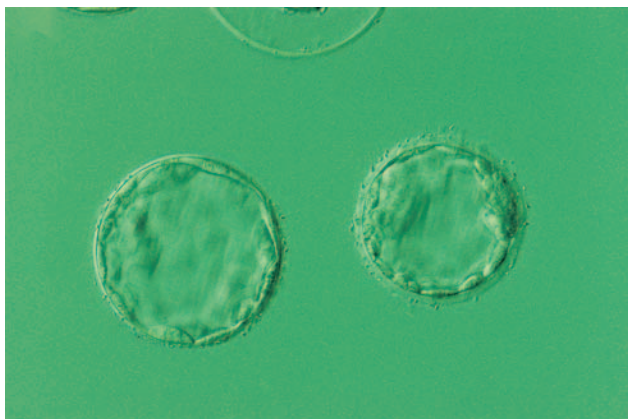
I přes rychlý vývoj v uplynulých téměř dvaceti letech zůstává efektivita léčby sterility metodou mimotělního oplodnění v průměru kolem 20 %. Kokultivace a prodloužené kultivace embryí v komplexních médiích embryí se mohou uplatnit především u žen s opakovaným selháním implantace ve standardním uspořádání IVF programu a současně prohlubují naše znalosti o vývoji a potřebách preimplantačních embryí.

## 5.1. Soubory a metodika

Ve skupině pacientek, jejichž embrya byla kokultivována na podložní tkáňové kultuře monolayeru Vero buněk, bylo 171 žen, jejichž embrya byla přenesena do dělohy za 48 h po odběru oocytů, a 63 žen, jejichž embrya byla transferována po 72 h kultivace. Kontrolní skupinu představovalo 184 žen s přenosem embryí po 48 h bez kokultivace.

Ve skupině žen s prodlouženou kultivací embryí v komplexních syntetických médiích HATCH a M3 bylo 188 pacientek, jejichž embrya byla transferována po 72 h, 164 žen s přenosem embryí po 96 h a 166 pacientek, jejichž embrya byla přenesena do dělohy po 120 h kultivace.

Pro kokultivace jsme používali čtyřjamkové kultivační nádobky (Nunclon) a základní tkáňová kultura Vero buněk byla udržována v médiu H-199 obohaceném o 7 % bovinního prekolostální séra (Bioveta). V den odběru oocytů byla provedena trypsinizace základní tkáňové kultury s použitím 0,05 % trypsinu a 0,02 % EDTA a připraven monolayer v médiu obohaceném 15 % inaktivovaného séra



Obr. 10. Blastocys-  
ty po 120 hodinách  
kultivace

pacientky. Po 20–24 h byly buňky základního monolayeru opakovaně promyty čistým médiem a do čerstvého média obohaceného sérem pacientky a na monolayer buněk podpůrné tkáňové kultury byla přenesena embrya. Až do transferu embryí nebylo médium dále měněno.

ÚSOL jako producent tkáňové kultury Vero buněk zaručuje jejich čistotu co se týká kontaminace plísněmi, bakteriemi, viry a mykoplazmaty. Za 24 h po odběru byla po mechanickém očištění provedena kontrola inseminovaných oocytů. Preembrya se dvěma prvojádry a druhým pólovým tělískem byla rozdělena do dvou skupin bez ohledu na indikaci IVF, věk pacientky a počet předchozích IVF cyklů a dále kultivována buď v samotném médiu H-199, nebo v médiu H-199 na podložní tkáňové kultuře Vero buněk. Normálně se vyvíjející embrya rostoucí v samotném médiu byla transferována po 48 h kultivace a embrya kokultivovaná byla přenesena do dělohy za 48 nebo 72 h. Počet transferovaných embryí byl omezen na nejvýše čtyři a všechna eventuální další embrya byla kryokonzervována.

U pacientek s prodlouženou kultivací v syntetických médiích byla embrya kultivována 48 h ve standardním IVF médiu a poté ve čtyřbuněčném stadiu přenesena do média M3 nebo HATCH-50 a transferována po 72, 96 nebo 120 h od získání oocytů.

Jako klinické těhotenství bylo hodnoceno každé těhotenství, u něhož byl ultrazvukem prokázán intrauterinně gestační váček. Statistické hodnocení bylo provedeno s použitím  $\chi$ -kvadrát testu.

## 5.2. Výsledky

Ve sledované skupině 171 žen, jejichž kokultivovaná embrya byla transferována po 48 h, jich otěhotnělo 41 (23,9 %) a nejlepších výsledků s kokultivacemi jsme docílili po transferech za 72 h: 20 těhotenství u 63 žen představuje úspěšnost 31,7 %. V kontrolní skupině 184 žen s kultivací embryí ve standardním IVF médiu a jejich přenosu po 48 h otěhotnělo 39 pacientek (20,9 %).

Ve skupině s použitím moderních komplexních syntetických médií otěhotnělo 51 žen (27,1 %) po transferu po 72 h, 44 žen (26,8 %) po 96 h a konečně 47 žen (28,3 %) po přenosu embryí po 120 h kultivace. Výsledky jsou sumárně uvedeny v tab. 17.

Tab. 17. Srovnání výsledků IVF po standardní kultivaci a prodloužené kultivaci po kokultivaci s Vero buňkami nebo v syntetickém komplexním médiu

		$\Sigma$ pacientek	$\Sigma$ grav./ET	%
Standard kultivace	48 hod	184	39	20,2
Kokultivace VERO	48 hod	171	41	23,9
Kokultivace VERO	72 hod	63	20	31,7
HATCH 50 + M3	72 hod	188	51	27,1
HATCH 50 + M3	96 hod	164	44	26,8
HATCH 50 + M3	120 hod	166	47	28,3

## 5.3. Závěr

Prodloužená kultivace embryí (ať již za pomoci kokultivačních systémů nebo ve speciálních komplexních médiích) ve všech případech zvýšila efektivitu IVF.

Tyto postupy rozšiřují možnosti terapeutického přístupu v rámci IVF tím, že umožňují individuální přístup ke každé pacientce.

Na základě více než dvouletých zkušeností s Vero buňkami lze říci, že jsme při jejich použití pro kokultivace lidských embryí v programu IVF nezaznamenali žádné komplikace (infekce, větší počet potratů). Použití nových komplexních médií tak nejen významně zjednodušilo a zpřístupnilo možnost prodloužených kultivací, ale eliminuje i (teoretická a námi neprokázaná) případná rizika kultivace embryí za přítomnosti jiných buněčných kultur.

Prodloužená kultivace zkvalitňuje výsledky IVF díky možnosti selekce životaschopných embryí a možnosti větší synchronizace mezi vývojem embrya a endometria.

## 6. KRYOKONZERVACE EMBRYÍ

Použití moderních stimulačních protokolů často vede k získání většího počtu oocytů a následně embryí, které není možné najednou přenést do dělohy bez vysokého rizika mnohočetného těhotenství. Toto nejen čistě odborné, ale též etické dilema řeší kryokonzervace embryí, jejíž výhody byly rozpoznány již v době rozvoje metodiky IVF.<sup>(219)</sup> Po úspěšné kryokonzervaci embryí ve veterinární medicíně jsou od roku 1984 dosahována těhotenství i po transferu rozmrazených lidských embryí.<sup>(27,147,211,216,243)</sup> Již v roce 1987 referoval Van Steirteghem na 5. světovém kongresu IVF o výsledcích multicentrické studie o kryokonzervaci embryí, kdy bylo ve 20 centrech porozeno 63 dětí. První zkušenosti s touto metodou publikoval v domácím písemnictví Hanzelka<sup>(65)</sup> a první úspěšná těhotenství s porodem zdravého plodu naše skupina.<sup>(117)</sup>

Dnes již existuje řada vypracovaných metod kryokonzervace, které jsou běžně používány v řadě IVF laboratoří po celém světě. Kryokonzervace nadpočetných embryí umožňuje jejich uchování a přenos v následných cyklech zvyšuje efektivitu IVF a současně řeší etický problém osudu těchto embryí. Kryokonzervace představuje také mimořádně efektivní řešení některých komplikací asistované reprodukce, např. případů hrozícího závažného hyperstimulačního syndromu.

Hlavním faktorem, který způsobuje poškození všech živých buněk při zamrazení a následném rozmrazení, je tvorba intracelulárního ledu a s tím spojené osmotické změny. Tomu se zabraňuje tím, že se buňky před zamrazením dostatečně dehydratují. Nutná je též přítomnost tzv. kryoprotektantů, které buňku chrání před poškozením a současně snižují bod tání protekčního média.

Dehydratace buněk je možné dosáhnout v principu dvěma způsoby. Při prvním způsobu probíhá dehydratace při teplotách pod bodem tuhnutí kryoprotekční směsi. Vyvoláním tvorby ledu v kryoprotekčním médiu se zvyšuje relativní koncentrace rozpuštěných látek a dochází k porušení osmotické rovnováhy na buněčné membráně. Aby se tato rovnováha obnovila, proniká voda z buňky do

okolního média a buňka se tím dehydratuje. Při dalším snížení teploty se tento jev opakuje, až v konečné fázi může dojít k téměř úplné dehydrataci. Snižování teploty musí být velmi pomalé, aby voda obsažená v buňce stačila prostupovat buněčnou membránou a nedošlo k jejímu zmrznutí uvnitř buňky.

Druhou možností dehydratace je použití látek, které neprocházejí buněčnou membránou, a umožňují tak prostup vody z buňky ve směru koncentračního gradientu. Pro tento účel se nejčastěji používá sacharóza. V praxi se někdy oba způsoby kombinují.

Po zmrazení je možno uchovávat buňky při teplotě kapalného dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) teoreticky po neomezenou dobu. Z důvodů etických i technických je třeba dobu skladování limitovat.

Způsoby rozmrazení se liší podle toho, jakým způsobem bylo provedeno zamrazení. V konečné fázi je pak třeba odstranit z buněk kryoprotektant. To se musí provádět postupně, aby nedošlo k nadměrnému nabobtnání buněk a jejich poškození. Zde se opět uplatňují látky typu sacharózy, které působí jako osmotický pufr.

První práce popisující normální vývoj myších embryí po zamrazení na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  se datují od počátku 70. let.<sup>(231,230)</sup> Pro lidská embrya byl tento postup poprvé použit v roce 1983.<sup>(216)</sup> Původní metody používaly pomalé ochlazení rychlostí  $-0,2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  za přítomnosti dimetylsulfoxidu (DMSO) jako kryoprotektantu a pomalé ohřívání ( $4\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) při rozmrazení. Od té doby byly metody kryokonzervace modifikovány za použití jiných kryoprotektantů nebo jejich směsí a byly vypracovány zkrácené postupy s rychlým rozmrazováním.<sup>(27,28,46,67,87,130,178,220)</sup> V současné době se pro kryokonzervaci lidských embryí nejčastěji používají metody založené na postupu popsaném Lassallem v roce 1985.<sup>(87)</sup> Jako kryoprotektant se používá  $1,5\text{ M}$  1,2-propandiol (PROH) za přítomnosti sacharózy, vzorek se ochlazuje rychlostí  $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a rozmrazení se provádí rychlostí asi  $200\text{--}300\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Jiný postup představuje tzv. »rapid freezing« či vitifikace. Metoda vyžaduje jednorázovou expozici embryí vysokým koncentracím kryoprotekčního média s následným ponořením do tekutého dusíku.<sup>(217,218)</sup> Výhodou proti klasickým metodám jsou minimální nároky na přístrojové vybavení a rychlost provedení (embrya se z pokojové teploty nebo teploty  $0\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$  dostávají přímo do tekutého dusíku), nevýhodou je vysoká koncentrace kryoprotektiva, která by při delším působení při laboratorní teplotě mohla působit toxicky. Pro lidská embrya použil tento postup poprvé Trounson v roce 1988<sup>(217)</sup> s použitím dimetylsulfoxidu jako kryoprotektiva.

Tyto práce přinesly rozšíření kryokonzervace prakticky do všech kvalitních IVF laboratoří. Ačkoli je stanovení ideálního kryokonzervačního protokolu obtížné, většina laboratoří dává přednost zamrazování embryí ve stadiu prvojader nebo v časných fázích jejich vývoje v PROH nebo DMSO.

Nové postupy kultivace embryí přinesly možnost kultivovat embrya až do stadia expandované blastocysty a popřípadě i nutnost kryokonzervace v těchto vývojových stádiích.<sup>(27,46,67)</sup> Pro tyto případy se jako kryoprotektant využívá glycerol obsažený ve stoupajících koncentracích v kryokonzervačním médiu a po seedingu a pomalém ochlazení na  $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$  následuje rychlé zmrazení na teplotu  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rozmrazení se provádí v temperované lázni s následným postupným vymytím přítomného glycerolu.

Výše zmíněné postupy tak umožňují kryokonzervaci všech vývojových stadií lidských preimplantačních embryí a umožňují optimální volbu léčebné strategie.

Výsledky kryokonzervace ovlivňuje řada faktorů:

- technické parametry (volba kryoprotektiva – glycerol, dimethylsulfoxid, 1,2-propandiol) v závislosti na použité metodě mrazení (řízená kryokonzervace, ultra-rapid freezing);
- embryonální faktory – kvalita kryokonzervovaných embryí patří mezi zásadní faktory ovlivňující výsledky; na tuto skutečnost opakovaně upozornila řada autorů;<sup>(27,54,100,227)</sup>
- mateřské faktory – především věk;<sup>(227)</sup>
- počet přenášených embryí, použitý stimulační protokol v původním IVF cyklu.

Skutečná efektivita kryokonzervace není z písemných prací snadno hodnotitelná, neboť řada autorů publikovala pouze malé soubory nebo výsledky u vybraných skupin pacientek.<sup>(100,211)</sup> Nověji publikoval soubor výsledků 897 kryotransferů Wang.<sup>(227)</sup> Ve sledovaném osmiletém období docílil po 897 přenosech rozmrazených kryokonzervovaných embryí 98 těhotenství (10,9 %). Mezi hlavními faktory ovlivňujícími dosažené výsledky uvádí věk pacientky, počet přenášených embryí a počet a kvalitu získaných oocytů v původním IVF cyklu. Vliv kvality embryí na výsledky kryokonzervace a naopak vliv kryokonzervace na kvalitu přenášených embryí dovolují posoudit výsledky z programu darovaných oocytů, kdy je část embryí pocházejících z oocytů stejné dárkyně přenášena v »čerstvém« stavu bez kryokonzervace a část po kryokonzervaci. Selick<sup>(165)</sup> ve své práci uvádí, že signifikantně větší počet kvalitních embryí ve vyšších vývojových stádiích lze nalézt při přenosu čerstvých embryí oproti rozmrazeným embryím, ačkoli následné hodnocení implantace čerstvých a rozmrazených embryí (19/151–12,6 % vers. 9/111–8,1 %) a těhotenství ukončených porodem (11/42–26,2 % vers. 6/45–13,3 %) neprokázalo statisticky signifikantní rozdíly. Autoři uzavírají, že kryokonzervace sice částečně negativně ovlivňuje kvalitu přenášených embryí, nemá však vliv na implantační a další vývojový potenciál vysoce kvalitních embryí.

## 6.1. Soubor a metodika

Do souboru jsou zařazeny pacientky, u kterých byla provedena kryokonzervace embryí získaných v programu IVF na Oddělení asistované reprodukce Ústavu pro péči o matku a dítě v letech 1991–1995 a od roku 1996 stejnou pracovní skupinou v Sanatoriu Pronatal.

Embrya byla zmrazována od stadia prvojader až po stadium expandované blastocysty, tj. od 18 do 120 h po oplození.

Kryokonzervace se prováděla metodou řízeného zmrazování na přístroji Planer Kryo 10/1,7 za použití 1,5 M 1,2-propandiolu a 0,1 M sacharózy (ve výjimečných případech s použitím 8% glycerolu u stadia blastocyst), nebo metodou vitrifikace s použitím 4M 1,2-propandiolu a 0,25M sacharózy. Podrobný popis námi užívaných protokolů je uveden v našich dříve publikovaných sděleních.<sup>(117,116)</sup> Metoda vitrifikace byla používána v letech 1991–1993, kdy nebylo ještě k dispozici kryokonzervační zařízení, v pozdější době pouze v časových úsecích, kdy toto zařízení nebylo možné použít.

Zamrazována byla:

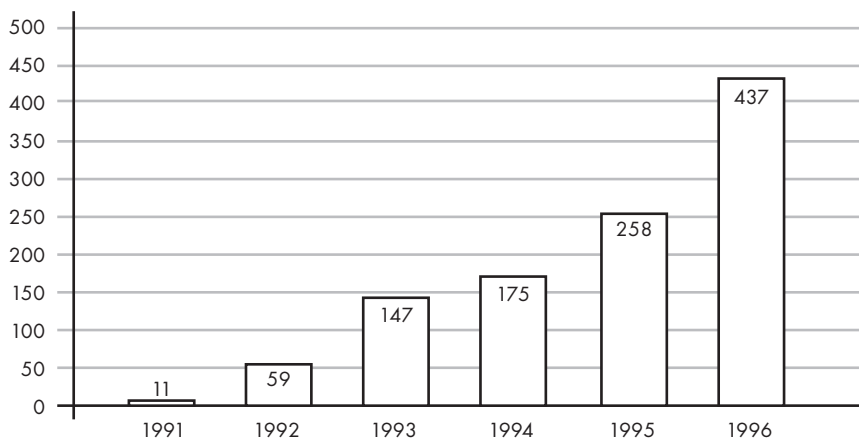
- »nadpočetná« embrya zbylá po přenosu čerstvých embryí;
- embrya ve stadiu prvojader. V případě většího počtu oplozených oocytů se určitý počet embryí zamrazoval už ve stadiu prvojader, po transferu se popřípadě dodatečně zamrazila zbylá embrya;
- všechna embrya u patientek s komplikacemi (hrozící závažný hyperstimulační syndrom, endometriální polypy detekované až během stimulace).

Po rozmrazení se embrya transferovala ihned, nebo se kultivovala obvykle 24–48 h v odpovídajícím kultivačním médiu podle stadia vývoje (IVF-50, Hatch-Scandinavian IVF Science).

Postupem času jsme opustili fixní protokoly přípravy před přenosem rozmrazených embryí a postupujeme individuálně. U spontánně ovulujících žen preferujeme ultrasonograficky a event. hormonálně sledované cykly s časováním ovulace pomocí aplikace hCG (Pregnyl). Přenos rozmrazených embryí plánujeme 48 h po proběhlé ovulaci. U patientek s anovulačními cykly volíme buď stimulaci ovulace nízkými dávkami hMG (Pergonal, Humegon, Menogon) či FSH (Metrodin), nebo přenášíme embrya do zcela arteficiálních HRT cyklů po přípravě endometria sekvenčním podáváním estradiolu a progesteronu.<sup>(102)</sup> HRT cykly volíme zásadně u patientek s PCO syndromem s rizikem hyperstimulace i po malých dávkách gonadotropinů a u patientek s úpornou anovulací vyžadující vysoké dávky gonadotropinů k dosažení normální folikulogeneze.

Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí Studentova t-testu.





Graf 12. IVF cykly s kryokonzervací embryí

## 6.2. Výsledky

Počet pacientek, u kterých byla provedena kryokonzervace embryí získaných v IVF cyklu, se v průběhu let výrazně zvyšoval (graf 12). Výsledky kryokonzervace v letech 1991–1996 jsou přehledně uvedeny v tab. 18.

Na vznik těhotenství po transferu kryokonzervovaných embryí má velký vliv kvalita zamrazených embryí (tab. 19). I když se kva-

Tab. 18. Výsledky kryokonzervace embryí 1991–1996

Rok	Cykly – rozmrazení	Kryotransfery (%)	Těhotenství (%)
1991	3	3 (100)	0
1992	17	17 (100)	1 (6)
1993	73	66 (90)	2 (3)
1994	124	119 (96)	4 (12)
1995	124	110 (89)	9 (8)
1996	254	223 (88)	17 (8)
celkem	595	538 (90,4)	43 (8)

Tab. 19. Vliv selekce embryí na výsledky po přenosu rozmrazených embryí

Skupina	Rozmrazení (kryo)	Kryotransfery (KET) (%)	Těhotenství	Grav./KET (%)	Grav./kryo (%)
»nadpočetná« embrya	474	451 (95)	33	7,3 +	7,0 ++
prvojádra a cykly bez ET	105	99 (94)	14	14,1 +	13,3 ++
celkem	579	550 (95)	47	8,5	8,1

+, ++ p < 0,05

lita embryí neprojevila v jejich schopnosti přežít kryokonzervaci (stejně procento kryotransferů na cyklus s rozmrazením), stupeň implantace byl signifikantně vyšší ve skupině, v níž byla zamrazena buď všechna embrya, nebo embrya ve stadiu prvojader. V těchto případech se před zamrazením neprováděla žádná negativní selekce a zamrazovaná embrya byla srovnatelná s embryi, která se transferovala v klasických IVF cyklech.

Druhým faktorem, který výrazně ovlivňuje implantaci, je kultivace embryí po rozmrazení. Až do nedávné doby doporučovala většina autorů kultivovat pouze embrya zamrazená ve stadiu prvojader, u rozdělených embryí se doporučovalo provést transfer pokud možno do jedné hodiny po rozmrazení. V loňském roce publikoval Kjekshus<sup>(83)</sup> lepší výsledky v případech, kdy byla kryokonzervovaná embrya před transferem kultivována 24 h. Tato skutečnost se potvrdila v našem souboru (tab. 20).

Podle našich zkušeností přežívají kryokonzervaci nejlépe embrya zamrazená ve stadiu prvojader. Proto u pacientek, u kterých je indikovaná kryokonzervace všech embryí, je nejvhodnější provést zamrazení již v tomto stadiu (tab. 21).

Všechna pracoviště, která provádějí kryokonzervaci embryí, shodně popisují sníženou schopnost implantace u rozmrazených embryí ve srovnání s embryi z původních IVF cyklů. Tento fakt může být do jisté míry ovlivněn výběrem embryí, určených ke kryokonzervaci. I když většina autorů uvádí, že zamrazují pouze kvalitní embrya, nejvyšší kvalita embryí jsou téměř vždy transferována v původním cyklu. Jestliže pacientka v původním cyklu neotěhotní, provádí se transfer méně kvalitních kryokonzervovaných embryí. Horší výsledky jsou tedy zcela logickým následkem.

Tab. 20. Vliv kultivace rozmrazených embryí před transferem na počet dosažených těhotenství

Skupina	Rozmrazení (kryo)	Kryotransfery (KET) (%)	Těhotenství	Grav./KET (%)	Grav./kryo (%)
bez kultivace	456	429 (94)	28	6,6 +	6,1 ++
s kultivací	123	121 (98)	19	15,7 +	15,4 ++
celkem	579	550 (95)	47	8,5	8,1

+, ++ p < 0,01

Tab. 21. Vliv vývojového stupně zamrazených embryí na počet dosažených těhotenství

Skupina	Rozmrazení (kryo)	Kryotransfery (KET) (%)	Těhotenství	Grav./KET (%)	Grav./kryo (%)
prvojádra	69	67 (97)	10	14,9 +	14,5 ++
48 hod	310	292 (94)	21	7,2 +	6,8 ++
72-120 h	200	191 (95)	16	8,4	8,0

+, ++ p < 0,05

V našem souboru jsme zejména zpočátku zamrazovali i méně kvalitní embrya (ve skupině »nadpočetných« embryí bylo téměř 60 % embryí výrazně horší kvality). Přesto i v této skupině bylo dosaženo 7 % těhotenství na cyklus s rozmrazením. Přežívání embryí po kryokonzervaci bylo velmi dobré – v 95 % všech případů se po rozmrazení realizoval kryotransfer. Lepších výsledků bylo dosaženo ve skupině, v níž se neprováděla primární selekce embryí pro transfer, tj. v případě zamrazení embryí již po 20 h kultivace, a u pacientek, u kterých byla zamrazena všechna embrya. V těchto případech bylo dosaženo 14 těhotenství na 99 kryotransferů.

Zajímavý výsledek je pozitivní vliv kultivace embryí po rozmrazení. Rozdíl v procentu těhotenství na kryotransfer ve skupině bez kultivace (6,6 %) a s kultivací (15,7 %) je vysoce statisticky významný. Tento postup také umožňuje vyřadit embrya, která se po rozmrazení nevyvíjejí. Ve většině případů se však i částečně poškozená embrya vyvíjela normálně a pouze ve výjimečných případech nemohl být kryotransfer proveden. Další výhodou je možnost lépe koordinovat jednotlivé pracovní úkony.

### 6.3. Závěr

Kryokonzervace embryí má na současném stupni vývoje asistované reprodukce nezastupitelné místo.

Zvyšuje efektivitu in vitro fertilizace – k těhotenstvím z původního cyklu po přenosu čerstvých embryí přistupuje dalších 8,5 % těhotenství po přenosu rozmrazených embryí (hodnoceno v celém souboru od počátků kryokonzervace na našem pracovišti), resp. dalších 15,7 % (pozdější vybraný soubor, kde již byly aplikovány modifikace celého postupu).

Řeší i etický problém tzv. nadpočetných embryí a je součástí strategie při prevenci a řešení komplikací asistované reprodukce.

## 7. OSUD TĚHOTENSTVÍ A PERINATÁLNÍ VÝSLEDKY V SOUBORU TĚHOTNÝCH ŽEN PO IVF A ET

Po narození Louisie Brownové se léčba sterility metodou mimotělního oplodnění stala rutinní terapeutickou metodou poskytující naději na těhotenství řadě do té doby neúspěšně léčených bezdětných párů. Díky této metodě se na celém světě narodilo – podle zprávy z 10. světového kongresu o IVF ve Vancouvru – již více než 300 000 dětí. Úspěšnost IVF je vyjadřována počty dosažených těhotenství, ačkoli jediným podstatným faktem zajímavým rodiče je narození zdravého dítěte. I když existuje řada celostátních registrů centralizujících data o efektivitě metody, o osudech těchto těhotenství a perinatálních výsledcích je prací mnohem méně. Výsledky těhotenství po IVF nelze jednoduše srovnávat s běžnou populací vzhledem k rozdílu ve výskytu takových rizikových faktorů, jako je věk, parita, anamnéza dlouhodobé sterility či anamnéza »poor reproductive performance«, stejně jako výrazně častější vícečetná těhotenství, která nutně ovlivňují perinatální výsledky. Sledovali jsme osud dosažených těhotenství v programu IVF v závislosti na četnosti těhotenství, způsobu porodu, termínu porodu a perinatální mortalitu.

### 7.1. Soubor a metodika

Od roku 1989 do roku 1995 otěhotnělo v našem programu IVF 596 žen, u kterých je znám osud těhotenství a výsledek porodu. Pouze u 180 porodů však bylo možno dohledat námi sledované údaje a tento soubor je předmětem bližšího rozboru.

Metody ovariální stimulace, odběr oocytů i kultivace a transfer embryí jsou podrobně popsány v našich předchozích pracích.<sup>(104, 103,106)</sup> Jako preklinické těhotenství (které jsme jinak cíleně nesledovali a uvedené případy představují pouze náhodný záchyt) jsme hodnotili případy, kdy luteální fáze trvala více než 20 dnů při hladině hCG vyšší než 50 mIU/ml, jestliže se nepodařilo vizualizovat amniální váček při ultrazvukovém vyšetření. Jako klinické těho-

tenství byla hodnocena gravidita s ultrazvukem prokázaným intrauterinně lokalizovaným plodovým vejcem, mimoděložní těhotenství bylo vždy prokázáno histologickým vyšetřením.

## 7.2. Výsledky

U 596 pacientek těhotných po mimotělním oplodnění oocyty a transferu embrya (embryí) bylo 405 gravidit ukončeno porodem (68 %), ostatní těhotenství skončila neúspěšně. V 34 případech (5,7 %) jsme zachytili biochemické těhotenství, ve 115 případech (19,3 %) těhotenství skončilo potratem a u dalších 42 pacientek (7,0 %) se jednalo o mimoděložní těhotenství (tab. 22).

Tabulka 23 hodnotí způsob porodu v závislosti na četnosti těhotenství. Ve 132 případech (73,3 %) se jednalo o porod jednoho plodu, ve 46 případech (25,5 %) o gemini a dvakrát o předčasný porod tří plodů. V celém souboru nalézáme mimořádně vysokou frekvenci císařských řezů (29,6 % při jednom plodu a 84,8 % při porodech dvojčat).

Při těhotenství s jedním plodem porodilo 88,6 % žen v termínu, ze zbylých 15 předčasných porodů byly pouze čtyři před ukončeným 34. týdnem těhotenství. Při těhotenství se dvěma plody 27 žen (58,7 %) naopak porodilo předčasně, z toho 12 před ukončeným 34. týdnem těhotenství. O velmi předčasné porody před 34. týdnem gravidity se jednalo u pacientek s trojčetným těhotenstvím (tab. 24).

V celém souboru bylo zaznamenáno celkem 10 perinatálních úmrtí. Jedno ve skupině těhotných s jedním plodem (7,5 ‰), celkem 7 ve skupině se dvěma plody (76 ‰) a zemřela dvě z velmi předčasně narozených trojčat (tab. 25).

Tab. 22. Osud těhotenství v programu IVF

Těhotenství	Počet	%
Biochemické	34	5,7
Klinický potrat	115	19,3
Mimoděložní těhotenství	42	7,0
Porod	405	68,0
Celkem	596	100

Tab. 23. Způsob porodu v závislosti na četnosti těhotenství

Počet plodů	Počet porodů	Spont. (%)	Forceps (%)	Sectio (%)
1	132	92 (69,7)	1 (0,7)	39 (29,6)
2	46	7 (15,2)	-	39 (84,8)
3	2	1 (50,0)	-	1 (50,0)

Tab. 24. Délka těhotenství v závislosti na četnosti

Počet plodů	> 37 týden (%)	> 34 týden (%)	< 34 týden (%)
1	117 (88,6)	11 (8,4)	4 (3,0)
2	19 (41,3)	15 (32,6)	12 (26,1)
3	-	-	2

Tab. 25. Perinatální mortalita v závislosti na četnosti těhotenství

Počet plodů	Počet těhotných	Perinatální úmrtí (%)
1	132	1 (0,75)
2	46	7a (7,60)
3	2	2b (33,33)

a - 3x odumření jednoho z dvojčat in utero

b - u jednoho z monozygotních dvojčat malformace neslučitelná se životem

Nehodnotíme-li biochemická těhotenství, která současné statistiky již neevoluují a také v našem souboru představují pouze náhodný záchyt, je 17,9 % těhotenství ukončených potratem číslo srovnatelné s údaji z literatury.<sup>(55,106,197)</sup> Pacientky zařazené do programu IVF představují samy o sobě rizikovou skupinu s vyšší frekvencí spontánních potratů a mimoděložních těhotenství. Zatímco riziko spontánního potratu v normální populaci je udáváno 10–15 %, <sup>(19)</sup> ve sterilní populaci se zvyšuje na 21,7–30,5 %.<sup>(228)</sup> K tomu přistupuje riziko spojené s ovariální stimulací, které sice závisí na použitém stimulačním schématu, neklesá však pod 20 %.<sup>(19)</sup>

Závažnou problematiku při hodnocení výsledků in vitro fertilizace představují mimoděložní těhotenství. Frekvence této komplikace se běžně udává mezi 5–7 %, <sup>(80)</sup> někteří autoři však uvádějí až 11 %.<sup>(93)</sup> Spíše než transfer embryí přímo do vejcovodů je příčinou vypuzení embryí z děložní dutiny do vejcovodů (většinou patologicky změněných) subendometriálními kontrakcemi myometria. Pro toto tvrzení svědčí výskyt oboustranných ektopických těhotenství po transferu více embryí po IVF<sup>(79,215)</sup> stejně jako ne zcela vzácný výskyt tzv. heterotopických těhotenství, tzn. těhotenství současně v dutině děložní i v ektopické lokalizaci.<sup>(150,158)</sup> Prevence této komplikace je nereálná, neboť rutinní oboustranná salpingektomie u všech pacientek je prakticky nemožná a navíc by situaci ani neřešila, neboť stále zbývá riziko intersticiální ektopické gravidity v děložním rohu. Frekvence ektopického těhotenství v našem souboru (5,6 %) je tedy plně srovnatelná s výsledky ostatních IVF skupin.

V literatuře lze najít i dostatečně rozsáhlé studie potvrzující naprosto normální psychosomatický a sociální vývoj dětí porozených po IVF. Olivennes publikoval ojedinelou studii 422 dětí ve věku 6–13 let a neprokázal žádný rozdíl oproti jejich »normálně« počatým

vrstevníkům.<sup>(134)</sup> Ke stejným závěrům u dětí narozených po přenosu rozmrazených embryí došel Sutcliffe<sup>(201)</sup> a Olivennes.<sup>(135)</sup>

Výskyt malformací u těhotenství po IVF je pečlivě celosvětově monitorován a je vzácný,<sup>(167,197)</sup> nepřevyšuje riziko v normální populaci. Toto riziko nezvyšuje ani ovariální stimulace.<sup>(175)</sup> V našem souboru se vyskytla jediná (s životem neslučitelná) malformace v případě trojčetného těhotenství, kdy bylo postiženo jedno z monozygotních dvojčat.

V našem souboru je poměrně vysoký počet vícečetných těhotenství (25,5 % všech porodů). Toto číslo – i když vysoké – je plně srovnatelné s výsledky ostatních pracovišť.<sup>(7,197)</sup> Vzhledem k vysokému mateřskému a zejména perinatálnímu riziku představují tato těhotenství jeden z velkých problémů asistované reprodukce. V České republice jsou od roku 1992 přenášena do dělohy maximálně čtyři embrya, všechna případná další »nadpočetná« embrya jsou kryokonzervována.<sup>(104)</sup> S optimalizací kultivačních podmínek a zvyšováním efektivity celé terapie je celosvětově evidentní trend ke snížení počtu přenášených embryí – jediné toto opatření může snížit incidenci výskytu vícečetných těhotenství. Jak ostatně vyplývá i z našich výsledků, výrazně horší perinatální výsledky (podmíněné především prematuritou) neovlivní ani vysoké procento císařských řezů značně převyšující údaje z normální populace. Tyto výsledky se však neliší od počtu operačních porodů a perinatálních výsledků po IVF publikovaných renomovanými pracovišti.<sup>(7,55,197)</sup> Kromě obtížně hodnotitelného liberálnějšího přístupu k indikaci císařského řezu u těchto »vzácných« těhotenství se na této skutečnosti podílí vysoký počet vícečetných těhotenství, vyšší průměrný věk matek a s ním spojená vyšší frekvence mateřských komplikací.

### 7.3. Závěry

Na základě našich výsledků lze konstatovat, že těhotenství dosažená v programu mimotělního oplodnění je nutno považovat za riziková. Oproti normální populaci není zvýšeno riziko vrozené vývojové vady, pravděpodobnost ukončení císařským řezem je však významně vyšší, stejně jako riziko předčasného porodu. Vysoká perinatální mortalita ve skupině žen s vícečetným těhotenstvím není ovlivněna ani frekvencí císařských řezů.

---

## PODĚKOVÁNÍ

In vitro fertilizace je záležitostí týmové práce, a proto by tato publikace nevznikla bez plného zaujetí a profesionality členů celé pracovní skupiny.

Děkuji všem lékařům a sestřám z klinického provozu i laboratorním pracovníkům a laborantkám za jejich práci a podporu nejen v dobách, kdy se práce dařila, ale zejména v těch okamžicích, kdy očekávané výsledky nepřicházely.

Zvláštní poděkování patří embryologům RNDr. Lucii Zetové-Vlachové a Mgr. Renatě Hüttelové za práci v oblasti mikromanipulací a prodloužené kultivace embryí, RNDr. Marii Mikové, CSc., za práci v oblasti kryokonzervace embryí, spolupracovníkům – gynekologům MUDr. Pavlu Müllerovi, MUDr. Janu Vobořilovi a MUDr. Jaroslavu Hulvertovi a dále ing. Alexandře Štroufové a ing. Haně Sochové za stanovení hormonálních hladin a urologovi MUDr. Vladimíru Sobotkovi za jeho podíl na řešení nejzávažnějších případů andrologické sterility.





---

# LITERATURA

1. ABDALLA, H. H. I., BABAU, R., KIRKLAND, A., et al.: A report on 100 cycles of oocyte donation: Factors affecting the outcome. *Hum. Reprod.*, 5, 1990, s. 1018–1022.
2. ABDALLA, H. I., AHUJA, K. K., LEONARD, T., et al.: Comparative trial of GnRH analogues/hMG and CC/HMG in assisted conception programme. *Fertil. Steril.*, 53, 1990, s. 473–479.
3. ABOULGHAR, M. A., MANSOUR, R. T., SEROUR, G. I., et al.: Prospective controlled randomized study of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in the treatment of tubal factor infertility with normal semen parameters. *Fertil. Steril.*, 66, 1996, s. 753–756.
4. ADAMS, C. E.: Aging and reproduction in the female mammal with particular reference to rabbit. *J. Reprod. Fertil.*, 12, 1979, (suppl.), s. 1–16.
5. AITKEN, R. J.: Assessment of sperm function for IVF. *Hum. Reprod.*, 3, 1988, s. 89–95.
6. AITKEN, R. J., ROSS, A., HARGREAVE, T., et al.: Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A 23187. Comparison of normospermic and oligospermic men. *J. Androl.*, 5, 1984, s. 321–329.
7. ANDREWS, M. C., MUASHER, S. J., LEVY, D. L., et al.: An analysis of the obstetric outcome of 125 consecutive pregnancies conceived in vitro and resulting in 100 deliveries. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 154, 1986, s. 848–852.
8. ANTINORI, S., VERSACI, C., HOSSEIN-GHOLAMI, G., et al.: A child is a joy at any age. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 1542.
9. ANTINORI, S., VERSACI, C., HOSSEIN-GHOLAMI, G., et al.: Oocyte donation in menopausal women. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 1487–1490.
10. ANTOINE, J. M., SALAT-BAROUX, J., ALVAREZ, S., et al.: Ovarian stimulation using HMG with or without LHRH analogues in a long protocol for IVF: A prospective randomized comparison. *Hum. Reprod.*, 5, 1990, s. 565–570.
11. BEN-RAFAEL, Z., BENADIVA, C. A., AUSMASAS, M., et al.: Dose of human menopausal gonadotropin influences the outcome of an in vitro fertilization programme. *Fertil. Steril.*, 48, 1987, s. 964–968.
12. BENADIVA, C., BEN-RAFAEL, Z., STRAUSS, J. F., et al.: Ovarian response of individuals to different doses of human menopausal gonadotropin. *Fertil. Steril.*, 49, 1988, s. 997–1001.
13. BERGH, C., HILLENSJO, T., WIKLAND, M., et al.: Adjuvant growth hormone treatment during in vitro fertilization : a randomized, placebo-controlled study. *Fertil. Steril.*, 62, 1994, s. 113–120.

14. BOLTON, V., HAWES, S. M., TAYLOR, C. T., et al.: Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates and development to the blastocysts. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 6, 1989, s. 30–37.
15. BONDUELLE, M., DESMYTTERE, S., BUYSSE, A.: Prospective follow-up study of 55 children born after subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 1765–1769.
16. BONDUELLE, M., LEGEIN, J., DERDE, M. P.: Comparative follow-up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and 130 children born after IVF. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 3327–3331.
17. BONDUELLE, M., LEGEIN, J., WILLIKENS, A.: Follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection. 11th Annual Meeting of ESHRE, Hamburg, 28.6. až 1.7.1995, Abstr. 108.
18. BONGSO, A., NG, S. C., FONG, C. Y., et al.: Cocultures: A new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil. Steril.*, 56, 1991, s. 179–191.
19. BOUE, A., BOUE, J.: Le rôle des anomalies chromosomiques dans les échecs de la reproduction. *J. Gynec. Obstet. Biol. Reprod.*, 6, 1977, s. 5–21.
20. BOUCHER, R.: Cystic fibrosis. In: ISSELBACHER, K., BRAUNWALD, E., WILSON, J., et al.: *Harrison's principles of internal medicine*. New York, McGraw-Hill 1994, s. 1194–1197.
21. BOWMAN, P., McLAREN, A.: Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 24, 1970, s. 203–207.
22. BUCKER, C., ISHIKAWA, M., SANDOW, B. A.: Transformation growth factor alpha improves fertilisation rate in immature mouse oocytes cultured in vitro. *Hum. Reprod.*, 6, 1991 (suppl. 1), s. 47.
23. CAMERON, I. T., O'SHEA, F. C., ROLLAND, J. M., et al.: Occult ovarian failure: A syndrome of infertility, regular menses and elevated FSH concentrations. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 67, 1988, s. 1190–1195.
24. COHEN, J., ELSNER, C., KORT, H., et al.: Impairment of the hatching process following IVF in the human: Improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum. Reprod.*, 5, 1990, s. 7–13.
25. COHEN, J., INGE, K. L., SUZMAN, M.: Video-cinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil. Steril.*, 51, 1989, s. 820–827.
26. COHEN, J., MALTER, H., FEHILLY, C., et al.: Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet*, 2, 1988, s. 162.
27. COHEN, J., SIMONS, R. F., EDWARDS, R. G., et al.: Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 2, 1985, s. 59–74.
28. COHEN, J., SIMONS, R. F., FEHILLY, C. B., et al.: Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3, 1986, s. 46–51.
29. CRAFT, I., TSIRIGOTIS, M.: Simplifies recovery, preparation, and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 1623–1627.
30. CUMMINS, J. M., PEMBER, S. M., JEQUIER, A. M., et al.: A test of human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: relationship to fertility and other seminal parameters. *J. Androl.*, 12, 1991, s. 98–103.

31. DAS, K., STOUT, L. E., HENSLEIGH, H. C., et al.: Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil. Steril.*, 55, 1991, s. 1000–1004.
32. DEVROEY, P., LIU, J., NAGY, Z., et al.: Normal fertilisation of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 62, 1994, s. 639–641.
33. DEVROEY, P., SILBER, S. J., NAGY, Z.: Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 903–906.
34. DIAMOND, M. P., MAXSON, W. S., VAUGHN, V. K., et al.: Antiestrogenic effect of clomiphencitrate in multiple follicular stimulation protocol. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3, 1986, s. 106–109.
35. DICKER, D., GOLDMAN, J. A., ASHKENAZI, J., et al.: Age and pregnancy rates in vitro fertilization. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 8, 1991, s. 141–144.
36. DIEDRICH, K., DIEDRICH, C., SANTOS, E.: Suppression of the endogenous LHRH surge by the GnRH antagonist Centrolerix during ovarian stimulation. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 788–792.
37. DOR, J., BEN-SHLOMO, I., LEVRAN, D., et al.: The relative success of GnRH analogues, clomiphene citrate and gonadotropins in 1099 cycles of IVF. *Fertil. Steril.*, 58, 1992, s. 986–991.
38. DOZORTSEV, D., RYBOUCHKIN, A., SUTTER, P. de, et al.: Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: A necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 2960–2964.
39. DOZORTSEV, D., RYBOUCHKIN, A., SUTTER, P. de: Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection: Role of the sperm cell. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 403–407.
40. DROESCH, K., MUASHER, S. J., BRZYSKI, R. G., et al.: Value of suppression with gonadotropin-releasing hormone agonist prior to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 51, 1989, s. 292–297.
41. EAGLESOME, M. D., HARE, W. C. D., SINGH, E. L.: Embryo transfer: A discussion on its potential for infectious diseases control based on a review of studies on infection of gametes and early embryos by various agents. *Can. Vet. J.*, 21, 1980, s. 106–112.
42. EDWARDS, R. G., FISHEL, S., COHEN, J.: Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1, 1983, s. 3–26.
43. EDWARDS, R. G., STEPTOE, P. C.: Current status of in vitro fertilization and implantation of human embryos. *Lancet*, 2, 1983, s. 1265–1269.
44. EDWARDS, R. G.: Pregnancies are acceptable in post-menopausal women. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 1542–1544.
45. EZRA, Y., SCHENKER, J. G.: Appraisal of in vitro fertilization. *Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.*, 48, 1993, s. 127–133.
46. FEHILLY, C. B., COHEN, J., SIMONS, R. F., et al.: Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: A comparative study. *Fertil. Steril.*, 44, 1985, s. 638–645.
47. FELICI, M. de, SYRACUSA, G.: Spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Res.*, 6, 1982, s. 107–113.

48. FILICORI, M., FLAMIGNI, C., COGNINI, G. E.: Different gonadotropin and leuporelin ovulation induction regimes markedly affect follicular fluid hormone levels and folliculogenesis. *Fertil. Steril.*, 65, 1996, s. 387–393.
49. FISHEL, S. B., JACKSON, P.: Follicular stimulation for high tech pregnancies. Are we playing it safe? *Brit. Med. J.*, 299, 1989, s. 309–311.
50. FIVNAT, P. C., MOUZON, J. de, BACHELOT, A., et al.: In vitro fertilization: influence of woman's age on pregnancy rates. *Hum. Reprod.*, 5, 1990, s. 56–59.
51. FLEMING, R., COUTTS, J. R.: Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women with endogenous gonadotropin suppression. *Fertil. Steril.*, 45, 1986, s. 226–230.
52. FORMAN, R. G., FRYDMAN, R., EGAN, D., et al.: Severe ovarian hyperstimulation syndrome using agonist of GnRH for IVF: An European series and a proposal for prevention. *Fertil. Steril.*, 1990, s. 502–510.
53. FORSDAHL, F., BERTHEUSSEN, K., BUNGUM, L. J.: A study on extended culture time with embryo replacement at the morula and blastocyst stage. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, (suppl. 4.), s. 142–143.
54. FREEMAN, L., TROUNSON, A. O., KIRBY, C.: Cryopreservation of human embryos: progress on the clinical use of the technique in human in vitro fertilization. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3, 1986, s. 53–61.
55. FRYDMAN, R., BELAISCH-ALLART, J., FRIES, N., et al.: An obstetric assessment of the first 100 births from the in vitro fertilization program at Clamart, France. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 154, 1986, s. 550–555.
56. FRYDMAN, R., CORNEL, C., ZIEGLER, D. de: Prevention of premature LH and P rise with a GnRH antagonist, Nal-Glu, in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil. Steril.*, 56, 1991, s. 923–928.
57. GARCIA, J. E., ACOSTA, A. A., JONES, G. S., et al.: Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: Phase I and II, 1981. *Fertil. Steril.*, 39, 1983, s. 167–179.
58. GINDOFF, P. R., JEWELEWICZ, R.: Reproductive potential in the older woman. *Fertil. Steril.*, 46, 1986, s. 989–1001.
59. GORDON, J. W., TALANSKY, B. E.: Assisted fertilization by zona drilling: A mouse model for correction of oligospermia. *J. Exp. Zool.*, 239, 1986, s. 347–354.
60. GORDON, J. W.: Use of micromanipulation for increasing the efficiency of mammalian fertilization in vitro. In: JONESS, H., SCHRADER, C. (Eds): *In vitro fertilization and other assisted reproduction*. A. NY Acad. Sci., 541, 1988, s. 601–613.
61. GOSDEN, R. G.: Maternal age: a major factor influencing the prospects and outcome of pregnancy. *A. NY Acad. Sci.*, 442, 1984, s. 45–47.
62. GREENBLATT, E. M., MERIANO, J. S., CASPER, R. F.: Type of stimulation protocol affects oocyte maturity, fertilization rate and cleavage rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 64, 1995, s. 557–563.
63. HAMBERGER, L., SJÖGREN, A., LUNDIN, K., et al.: Microfertilization techniques—the Swedish experience. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 1995, s. 263–268.
64. HAN, L., KOKKONEN, G. C., ROTH, G. S.: Effect of aging on population of estrogen receptor-containing cells in the rat uterus. *Exp. Cell Res.*, 180, 1989, s. 234–242.
65. HANZELKA, Z., TESÁŘÍK, J., LOPATÁŘOVÁ, M., et al.: První zkušenosti s kryokonzervací lidských embryí. *Čes. Gynek.*, 54, 1989, s. 729–733.

66. HARLOW, G. M., QUINN, P.: Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35, 1982, s. 187–193.
67. HARTSHORNE, G. M., ELDER, K., CROW, J.: The influence of in vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum. Reprod.*, 6, 1991, s. 136–141.
68. HASSOLD, T., JACOBS, P., KLINE, J.: Effects of maternal age on autosomal trisomies. *A. Hum. Genet.*, 44, 1980, s. 29–34.
69. HELLEBAUT, S., SUTTER, P. de, ONGHENA, A.: Does assisted hatching improve implantation rates after IVF or ICSI in all patients: A prospective randomized study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12, 1995, Abstr. 321, s. 1075.
70. HODGEN, G. D., BURKMAN, L. J., CODDINGTON, Ch. C.: The hemizona assay (HZA): finding sperm that have the »right stuff«. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 5, 1988, s. 311–313.
71. HOFMANN, G. E., TONER, J. P., MUASHER, S. J., et al.: High dose follicle stimulating hormone (FSH) ovarian stimulation in low responder patients for in vitro fertilization. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 6, 1989, s. 285–289.
72. HUGHES, E. G., FEDORKOW, D. M., DAYA, S., et al.: The routine use of GnRH agonists prior to IVF and GIFT: A metaanalysis of randomized controlled trials. *Fertil. Steril.*, 58, 1992, s. 888–897.
73. HUGHES, S. M., HUANG, Z. H., MORRIS, I. D., et al.: A double blind cross-over controlled study to evaluate the effect of biosynthetic growth hormone on ovarian stimulation in previous poor responders to in vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 13–18.
74. HUISMAN, G. J., LEERENTVELD, R. A., VERHOEFF, A., et al.: IVF results following transfer after 5 days of embryo culture. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, (suppl. 4.), s. 33.
75. CHAN, S. Y. W., WANG, C., CHAN, S. T. H., et al.: Differential evaluation of a human sperm hypoosmotic swelling test and its relationship with the outcome of IVF of human oocytes. *Hum. Reprod.*, 5, 1990, s. 84–88.
76. IRVINE, D. S., AITKEN, R. J.: Measurement of intracellular calcium in human spermatozoa. *Gamete Res.*, 16, 1986, s. 57–72.
77. JAMES, W.: The causes of the decline in fecundability with age. *Soc. Biol.*, 26, 1979, s. 330–339.
78. JEYENDRAN, R. S., VEN, H. H. van der, PEREZ-PALAEZ, M.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70, 1984, s. 219–226.
79. JONG-CHOU, Ch., YIH, L., TA-TEH, S.: Bilateral tubal pregnancy after IVF and ET. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 8, 1991, s. 292–296.
80. KARANDE, V. C., FLOOD, J. C., HEARD, N., et al.: An analysis of ectopic pregnancies resulting from in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 6, 1991, s. 446–450.
81. KENTENICH, H., PACHALLY, J., SCHMIADY, H.: Prognostischer Wert von Spermogramm Parametern für den IVF Erfolg. *Fertilität*, 3, 1987, s. 151–156.
82. KIESSLING, A. A., LOUTRADIS, D., McSHANE, P.M., et al.: Fertilization in trypsin-treated oocytes. In: JONES, H. W. JR., SCHRADER, C. (Eds): *In vitro fertilization and other assisted reproduction*. A. NY Acad. Sci., 541, 1988, s. 614–620.
83. KJEKSHUS, E. A., TANBO, T., ABYHOLM, T.: A happy change in the cryopreservation protocol. *Hum. Reprod.*, 11, 1996, Abstract Book 1, s. 80.

84. LANE, M., GARDNER, D. K.: Effect of incubation volume and density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Hum. Reprod.*, 7, 1992, s. 558–562.
85. LANZENDORF, S. E., MALONEY, M. K., VEECK, L. L., et al.: A pre-clinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil. Steril.*, 49, 1988, s. 835–842.
86. LANZENDORF, S., MALONEY, M., ACKERMAN, S.: Fertilizing potential of acrosome-defective sperm following microsurgical injection into eggs. *Gamete Res.*, 19, 1988, s. 329–337.
87. LASSALLE, B., TESTART, J., RENARD, J. P.: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2-propanediol. *Fertil. Steril.*, 44, 1985, s. 645–651.
88. LAUFER, N., CHERNEY, A. H. de, TARLATZIS, B.: Delaying HCG administration in HMG induced cycles decreases successful IVF of human oocytes. *Fertil. Steril.*, 42, 1984, s. 198–203.
89. LENTON, E. A., SEXTON, E., LEE, S., et al.: Progressive changes in LH and FSH and LH:FSH ratios in women throughout reproductive life. *Maturitas*, 10, 1988, s. 35–39.
90. LEVRAN, D., BEN-SHLOMO, I., DOR, J., et al.: Aging of endometrium and oocytes: Observations on conception and abortion rates in an egg donation model. *Fertil. Steril.*, 56, 1991, s. 1091–1094.
91. LIN, T. P.: Microinjection of mouse eggs. *Sci.*, 151, 1966, s. 333–337.
92. LIU, J., NAGY, Z., JORIS, H., et al.: Intracytoplasmic sperm injection does not require special treatment of the spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 1127–1130.
93. LOPATA, A.: Concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 40, 1983, s. 289–301.
94. LOUMAYE, E., BILLION, J. M., MINE, J. M., et al.: Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of clomiphene citrate challenge test. *Fertil. Steril.*, 53, 1990, s. 295–301.
95. LUTJEN, P., TROUNSON, A., LEETON, J., et al.: The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Sci.*, 307, 1984, s. 174–175.
96. MacLACHLAN, V., BESANKO, M., O'SHEA, F.: A controlled study of luteinizing hormone-releasing agonist (Buserelin) for the induction of folliculogenesis before in vitro fertilization. *N. Engl. J. Med.*, 320, 1989, s. 1233–1237.
97. MacNAMEE, M. C., EDWARDS, R. G., HOWLES, C. M.: Short-term luteinizing hormone releasing hormone agonist treatment: Prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 52, 1989, s. 264–269.
98. MacNAMEE, M. C., HOWLES, C. M., EDWARDS, R. G.: Pregnancies after IVF when high tonic LH is reduced by long term treatment with GnRH agonist. *Hum. Reprod.*, 2, 1987, s. 569–573.
99. MANDELBAUM, J., PLACHOT, M., JUNCA, A. M.: The effects of partial zona dissection on in vitro development and hatching of human cryopreserved embryos. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, (suppl. 4.), s. 39.
100. MANDELBAUM, J., JUNCA, A. M., PLACHOT, M.: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum. Reprod.*, 3, 1988, s. 117–119.
101. MANSOUR, R. T., ABOULGHAR, M. A., SEROUR, G. I.: The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 64, 1995, s. 982–986.

102. MARDEŠIĆ, T., MIKOVÁ, M., MÜLLER, P., et al.: Těhotenství a porod po přenosu rozmražených embryí do cyklu bez žlutého těliska s uměle připraveným endometriem po předchozí aplikaci analoga GnRH. *Čes. Gynek.*, 62, 1997, s. 19–21.
103. MARDEŠIĆ, T., MÜLLER, P., ZETOVÁ, L., et al.: Selektivní redukce mnohočetných těhotenství v prvním trimestru: výsledky a zkušenosti u 10 případů. *Čs. Gynek.*, 58, 1993, s. 115–119.
104. MARDEŠIĆ, T., MÜLLER, P., ZETOVÁ, L., et al.: Vícečetná těhotenství v programu IVF a ET v ÚPMD. *Čs. Gynek.*, 57, 1992, s. 102–108.
105. MARDEŠIĆ, T., ZETOVÁ, L., HÜTTELOVÁ, R., et al.: Intracytoplasmatická injekce spermie (ICSI) v léčbě nejzávažnějších případů andrologické sterility. *Čes. Gynek.* v tisku.
106. MARDEŠIĆ, T., ZETOVÁ, L., MÜLLER, P., et al.: Multiple pregnancies as a result of IVF and ET in a program without cryopreservation possibility. *Zbl. Gynec.*, 115, 1993, s. 24–26.
107. MARDEŠIĆ, T.: Faktory ovlivňující výsledky in vitro fertilizace. II. Vliv andrologického faktoru. *Čes. Gynek.*, 59, 1994, s. 306–309.
108. MATSUDA, I., HOTII, Y., OGURA, K., et al.: Chromosomal survey of 1001 subfertile males: Incidence and clinical features of males with chromosomal anomalies. *Acta Urol. Jap.*, 38, 1992, s. 803–809.
109. MATTSON, B. E., ROSENBLUM, I. Y., SMITH, R. M., et al.: Autoradiographic evidence for insulin and insulin-like growth factor binding to early mouse embryos. *Diab.*, 37, 1988, s. 585–589.
110. MAXSON, V. S., PITTAWAY, D. E., WENTZ, A. C.: Antiestrogenic effect of clomiphencitrate: Correlation with serum estradiol concentrations. *Fertil. Steril.*, 42, 1984, s. 356–359.
111. MEDICAL RESEARCH INTERNATIONAL. SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY: In vitro fertilisation-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1990 results from the IVF-ET registry. *Fertil. Steril.*, 57, 1992, s. 15–24.
112. MEDICAL RESEARCH INTERNATIONAL. SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY. THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY: In vitro fertilization-embryotransfer (IVF-ET) in the United States. 1989 results from the IVF-ET registry. *Fertil. Steril.*, 55, 1991, s. 14–23.
113. MELDRUM, D. R.: Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertil. Steril.*, 59, 1993, s. 1–5.
114. MENEZO, Y. J. R., GUERIN, J. F., CZYBA, J. C.: Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of Vero cells. *Biol. Reprod.*, 42, 1990, s. 301–308.
115. MENKEN, J., TRUSSEL, J., LARSEN, U.: Age and infertility. *Sci.*, 233, 1986, s. 1389–1394.
116. MIKOVÁ, M., GROCHOLOVÁ, R., MARDEŠIĆ, T., et al.: Kryokonzervace embryí v programu IVF-ET v Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze. *Čes. Gynek.*, 60, 1995, s. 145–149.
117. MIKOVÁ, M., ZETOVÁ, L., MARDEŠIĆ, T., et al.: Kryokonzervace embryí v programu IVF/ET. *Čes. Gynek.*, 58, 1993, s. 166–170.
118. MORDEL, N., SCHNEKER, J. G.: GnRH agonists and ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 2009–2015.
119. MUASHER, S. J., OEHNINGER, S., SIMONETTI, S., et al.: The value of basal and stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulated response and in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.*, 50, 1988, s. 298–307.



120. MUASHER, S. J.: Treatment of low responders. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10, 1993, s. 115–117.
121. NAGY, Z. P., LIU, J., CECILE, J., et al.: Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 63, 1995, s. 808–815.
122. NAGY, Z. P., LIU, J., JORIS, H.: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 1123–1129.
123. NAVOT, D., ANDERSON, T. V., DROECK, K., et al.: Hormonal manipulation of endometrial maturation. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 68, 1989, s. 801–807.
124. NAVOT, D., BERGH, P. A., WILLIAMS, M. A., et al.: Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female infertility. *Lancet*, 337, 1991, s. 1375–1377.
125. NAVOT, D., ROSENWAKS, Z.: The use of FSH for controlled ovarian hyperstimulation in IVF. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 5, 1988, s. 3–14.
126. NAVOT, D., ROZENWAKS, Z.: Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet*, 2, 1987, s. 645–647.
127. NIELSEN, J., SILLESEN, I.: Incidence of chromosome aberrations among 11.148 newborn children. *Hum. Genet.*, 30, 1975, s. 1–12.
128. NIJS, M., GEERTS, L., ROSENDAAAL, E., et al.: Prevention of multiple pregnancies in an in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.*, 59, 1993, s. 1245–1250.
129. OBRUCA, A., STROHMER, H., SAKKAS, D.: Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 1723–1726.
130. OEHNINGER, S., TONER, J. P., VEECK, L. L.: Performance of cryopreserved pre-embryos obtained in IVF cycles with or without a GnRH agonist. *Fertil. Steril.*, 57, 1992, s. 620–625.
131. OEHNINGER, S., VEECK, L. L., LANZENDROF, S. E., et al.: Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. *Fertil. Steril.*, 64, 1995, s. 977–981.
132. OLIVENNES, F., FANCHIN, R., BOUCHARD, P., et al.: The single or dual administration of the GnRH antagonist centorelix prevents premature LH surges in an IVF-ET program. *Fertil. Steril.*, 62, 1994, s. 468–476.
133. OLIVENNES, F., FANCHIN, R., ZIEGLER, D. de, et al.: Poor responders: Screening and treatment possibilities. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10, 1993, s. 115–117.
134. OLIVENNES, F., KERBRAT, V., RUFAT, P., et al.: Follow-up of a cohort of 422 children aged 6 to 13 years conceived by in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 67, 1997, s. 284–289.
135. OLIVENNES, F., SCHNEIDER, Z., REMY, V., et al.: Perinatal outcome and follow-up of 82 children aged 1 to 9 years old conceived from cryopreserved embryos. *Hum. Reprod.*, 11, 1996, s. 1565–1568.
136. PADILLA, S. L., BAYATI, J., GARCIA, J. E.: Prognostic value of early serum estradiol response to leuprolide acetate in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 53, 1990, s. 288–294.
137. PADILLA, S. L., GARCIA, J. E.: Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome. *Fertil. Steril.*, 52, 1989, s. 270–273.
138. PALERMO, G. D., COHEN, J., ALIKANI, M., et al.: Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 63, 1995, s. 1231–1240.

139. PALERMO, G., JORIS, H., DEVROEY, P., et al.: Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 1992, s. 17–18.
140. PALERMO, G., JORIS, H., TOURNAYE, H., et al.: Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 59, 1993, s. 826–835.
141. PANTOS, K., MEIMETI-DAMIANAKI, T., VAXEVANOGLU, T.: Oocyte donation to women after natural menopause. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 488–491.
142. PATRIA, B. C., DEY, S. K.: Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 4756–4760.
143. PAYNE, D., FLAHERTY, S. P., JEFFREY, R., et al.: Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 2051–2057.
144. PEIRS, A. I., LOPATA, A., GRONOW, M. J., et al.: Analysis of the benefits and risks of the multiple embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 39, 1983, s. 468–471.
145. PORTER, R. N., SMITH, W., CRAFT, I., et al.: Induction of ovulation for IVF using Buserelin and gonadotrophins. *Lancet*, 2, 1992, s. 1284–1285.
146. QUIGLEY, M., SCHMIDT, C. L., BEAUCHAMP, P. J., et al.: Enhanced follicular recruitment in an IVF programme: CC alone versus CC/HMG combination. *Fertil. Steril.*, 42, 1984, s. 25–33.
147. QUINN, P., KERIN, J. F. P.: Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3, 1986, s. 40–45.
148. RICHARDSON, S. J., NELSON, J. F.: Follicular depletion during the menopausal transition. *A. NY Acad. Sci.*, 592, 1990, s. 13–20.
149. RIORDAN, J. R., ROMMENS, J. M., KEREMN, B.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Sci.*, 245, 1989, s. 1066–1073.
150. RIZK, B., LIN TAN, S., MORCOS, S., et al.: Heterotopic pregnancies after in vitro fertilization and embryo transfer. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 164, 1991, s. 161–165.
151. ROMEU, A., MUASHER, S. J., ACOSTA, A., et al.: Results of in vitro fertilization attempts in women of 40 years of age and older: The Norfolk experience. *Fertil. Steril.*, 47, 1987, s. 130–136.
152. ROMMENS, J. M., IANNUZZI, M. C., KEREM, B.: Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Sci.*, 245, 1989, s. 1059–1065.
153. RON-EL, R., HERMAN, A., GOLAN, A., et al.: Gonadotropins and combined gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin protocols in a randomized prospective study. *Fertil. Steril.*, 56, 1991, s. 574–578.
154. ROSENWAKS, Z., MUASHER, S. J., ACOSTA, A. A.: Use of HMG and/or FSH for multiple follicle development. *Clin. Obstet. Gynec.*, 29, 1986, s. 148–157.
155. ROZSTEJN, D. A., ASCH, R. H.: Effect of aging on assisted reproductive technologies (ART): Experience from egg donation. *Semin. Reprod. Endocrin.*, 9, 1991, s. 272–279.
156. RUSSEL, J. B., POLAN, M. L., CHERNEY, A. de: The use of pure FSH for ovulation induction in normal ovulatory women in an IVF program. *Fertil. Steril.*, 45, 1986, s. 829–833.

157. RYBOUCHKIN, A., DOZORTSEV, D., SUTTER, P. de, et al.: The mouse oocyte activation test has a predictive value for the outcome of intracytoplasmic sperm injection in the human. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, Abstracts of 11th Annual meeting of ESHRE, Abstr. 042.
158. SALAT-BAROUX, J., GIACOMINI, P., CORNET, D.: Caractéristiques des grossesses obtenues par fécondation in vitro. *J. Gynec. Obstet. Biol. Reprod.*, 14, 1985, s. 365–374.
159. SAUER, M. V., PAULSON, R. J., LOBO, R. A.: A preliminary report on oocyte donation extending reproduction potential of women over 40. *N. Engl. J. Med.*, 323, 1990, s. 1157–1160.
160. SAUER, M. V., PAULSON, R. J., LOBO, R. A.: Pregnancy after age 50. Application of oocyte donation to women after natural menopause. *Lancet*, 2, 1993, s. 322–323.
161. SAUNDERS, D. M., LANCASTER, P. A. L., PEDISICH, E. L.: Increased pregnancy failure rates after clomiphene following assisted reproductive technology. *Hum. Reprod.*, 7, 1992, s. 1154–1159.
162. SCOOLCRAFT, W., SCHLENKER, T., GEE, M.: Assisted hatching in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil. Steril.*, 63, 1994, s. 551–554.
163. SCOTT, R. T., HOFMANN, G. E., OEHNINGER, S., et al.: Intercycle variability of the day 3 FSH levels and its effect on stimulation quality in IVF. *Fertil. Steril.*, 54, 1990, s. 297–306.
164. SCOTT, R. T., TONER, J. P., MUASHER, S. J., et al.: Follicle-stimulating hormone levels on day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.*, 51, 1989, s. 651–654.
165. SELICK, C. E., HOFMANN, G. E., ALBANO, C., et al.: Embryo quality and pregnancy potential of fresh compared with frozen embryos—is freezing detrimental to high quality embryos. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 392–395.
166. SEOUD, M. A. F., TONER, J. P., KRUTHOFF, C., et al.: Outcome of twin, triplet and quadruplet in vitro fertilization pregnancies. *Fertil. Steril.*, 57, 1992, s. 825–834.
167. SEPPÄLLÄ, M.: The world collaborative report on in vitro fertilisation and embryo replacement: Current state of the art in January 1984. *A. NY Acad. Sci.*, 442, 1985, s. 558–563.
168. SERAFINI, P., STONE, B., KERIN, J., et al.: An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in »poor-responders«: Pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil. Steril.*, 49, 1988, s. 90–95.
169. SERHAL, P. F., CRAFT, I. L.: Oocyte donation in 61 patients. *Lancet*, 1, 1989, s. 1185–1187.
170. SHAPIRO, M., TALBERT, G. B.: The effect of maternal age on decidualisation in the mouse. *J. Geront.*, 29, 1974, s. 145–148.
171. SHAW, R. W., NDUKWE, G., IMOEDEMHE, D. A. G.: Twin pregnancy pituitary desensitisation with LHRH agonist and pure FSH. *Lancet*, 2, 1985, s. 506–507.
172. SHER, G., HERBERT, C., JACOBS, M. H.: Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Hum. Reprod.*, 6, 1991, s. 232–237.
173. SHERMAN, B. W., WEST, J. H., KORENAMN, S. G.: The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 42, 1976, s. 629–637.

174. SHRIVASTAV, P., NADKARNI, P., WENSVOORT, S., et al.: Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 2058–2061.
175. SCHATZ, M., JEWELEWICZ, R., DYRENFURTH, Y., et al.: The use of hMG and hCG for induction of ovulation. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 138, 1980, s. 801–807.
176. SCHOYSMAN, R., VANDERZWALMEN, P., NIJS, M., et al.: Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*, 342, 1993, s. 1237.
177. SCHWARTZ, P., MAYAUX, M. J.: Female fecundity as a function of age. *N. Engl. J. Med.*, 306, 1982, s. 404–406.
178. SIEBZEHRÜBL, E., TODOROW, S., UEM, J. van: Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one cell embryos. Comparison of dimethylsulfoxide and 1,2-propanediol. *Hum. Reprod.*, 4, 1989, s. 312–317.
179. SILBER, S. J., ASCH, R., BALMACEDA, J., et al.: Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: A new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil. Steril.*, 50, 1988, s. 525–528.
180. SILBER, S. J., DEVROEY, P., TOURNAYE, H., et al.: Fertilizing capacity of epididymal and testicular sperm using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 1995, s. 281–293.
181. SILBER, S. J., NAGY, Z. P., LIU, J., et al.: Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 1705–1709.
182. SILBER, S. J., ORD, T., BALMACEDA, J., et al.: Congenital absence of the vas deference: The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N. Engl. J. Med.*, 323, 1990, s. 1788–1792.
183. SILBER, S. J.: The relationship of abnormal semen parameters to male infertility. *Hum. Reprod.*, 4, 1989, s. 947–954.
184. SOBEK, A., HRBKOVÁ, K., PRIESNITZ, J.: První těhotenství v České republice dosažené po fertilizaci oocyty pomocí ICSI – intracytoplasmatické injekce jedné spermie. *Čes. Gynek.*, 61, 1996, s. 3–6.
185. SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY: The American Fertility Society: Assisted reproductive technology in the United States and Canada. 1991 results from the Society for Assisted Reproductive Technology generated from The American Fertility Society Registry. *Fertil. Steril.*, 59, 1993, s. 956–962.
186. SPEIRS, A. I., LOPATA, A., GRONOW, M. J., et al.: Analysis of the benefits and risks of the multiple embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 39, 1983, s. 468–471.
187. STAESSEN, C., CAMUS, M., BOLLEN, N., et al.: The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil. Steril.*, 57, 1992, s. 620–630.
188. STAESSEN, C., JANSSENSWILLEN, C., ABBEEL, E. van den, et al.: Avoidance of triplet pregnancies by elective transfer of two good quality embryos. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 1650–1653.
189. STAESSEN, C., NAGY, Z. P., JANSSENSWILLEN, C., et al.: One years' experience with elective transfer of two good quality embryos in the human IVF and ICSI programmes. *Hum. Reprod.*, 10, 1995, s. 3305–3312.
190. STANGER, J. D., YOVICH, J. L.: Reduced IVF of human oocytes from patients with raised basal luteinizing levels during the follicular phase. *Brit. J. Obstet. Gynaec.*, 92, 1985, s. 385–393.

191. STEIN, Z. A., RUFAS, O., AMIT, S.: Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 63, 1995, s. 838–841.
192. STEIN, Z. A.: Women's ages: Childbearing and childrearing. *Amer. J. Epidemiol.*, 121, 1985, s. 327–342.
193. STEIRTEGHEM, A. C. van, ELST, J. van der, ABBEEL, E. van den, et al.: Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 62, 1994, s. 775–780.
194. STEIRTEGHEM, A. C. van, LIU, J., JORIS, H.: Assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 1994, s. 85–89.
195. STEIRTEGHEM, A. C. van, LIU, J., JORIS, H., et al.: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 1055–1060.
196. STEIRTEGHEM, A. C. van, NAGY, Z., JORIS, H., et al.: High fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 1061–1066.
197. STEPTOE, P. C., EDWARDS, R. G., WALTERS, D. E.: Observations on 767 clinical pregnancies and 500 births after human IVF. *Hum. Reprod.*, 1, 1986, s. 89–94.
198. STEPTOE, P. C., EDWARDS, R. G.: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2, 1978, s. 366–368.
199. STERZIK, K., DALLENBACH, C., SCHNEIDER, U., et al.: In vitro fertilization: The degree of endometrial insufficiency varies with the type of ovarian stimulation. *Fertil. Steril.*, 50, 1988, s. 457–462.
200. STICE, S. L., ROBL, J. M.: Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 25, 1990, s. 272–280.
201. SUTCLIFFE, A., D'SOUZA, S., CADMAN, J., et al.: Outcome in children from cryopreserved embryos. *Arch. Dis. Child*, 72, 1995, s. 290–293.
202. SUTTER, P. de, DOZORTSEV, D., CHEN, Q., et al.: Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 11, 1996, s. 595–597.
203. TAN, S. L., KINGSLAND, C., CAMPBELL, S.: The long protocol of administration of GnRH-a is superior to the short protocol for ovarian stimulation for IVF. *Fertil. Steril.*, 57, 1992, s. 810–815.
204. TAN, S. L., ROYSTON, P., CAMPBELL, S., et al.: Cumulative conception and livebirth rates after in vitro fertilisation. *Lancet*, 339, 1992, s. 1390–1394.
205. TANBO, T., ABYHOLM, T., BJORO, T., et al.: Ovarian stimulation in previous failures from in vitro fertilization: Distinction between two groups of poor responders. *Hum. Reprod.*, 5, 1990, s. 811–815.
206. TANBO, T., DALE, P. O., ABYHOLM, T., et al.: Follicle stimulating hormone as a prognostic indicator in clomiphene citrate/human menopausal gonadotrophin stimulated cycles for in vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 4, 1989, s. 647–650.
207. TANBO, T., DALE, P. O., LUNDE, O., et al.: Prediction of response to controlled ovarian hyperstimulation: a comparison of basal and clomiphene citrate stimulated follicle-stimulating hormone levels. *Fertil. Steril.*, 57, 1992, s. 819–824.
208. TARLATZIS, B., PADOS, G., BONTIS, J.: Ovarian stimulation with Buserelin/HMG/HCG: Prospective randomized study of short versus long protocol. *Hum. Reprod.*, 8, 1993, s. 807–812.

209. TESARIK, J., SOUSA, M., TESTART, J.: Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 9, 1995, s. 511–518.
210. TESARIK, J., SOUSA, M.: Comparison of Ca<sup>2+</sup> responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 62, 1994, S. 1197–1204.
211. TESTART, J., LASSALLE, B., BELAISCH-ALLART, J.: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil. Steril.*, 46, 1986, s. 268–272.
212. TONER, J. P., PHILPUT, C. B., JONES, G. S., et al.: Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil. Steril.*, 55, 1991, s. 784–790.
213. TOURNAYE, H., DEVROEY, P., LIU, J., et al.: Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: A new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deference. *Fertil. Steril.*, 61, 1994, s. 1045–1051.
214. TOURNAYE, H., LINDEN, M. van der, ABBEEL, E. van den, et al.: Mouse in vitro fertilization using sperm treated with pentoxiphylline and 2-deoxyadenosine. *Fertil. Steril.*, 62, 1994, s. 644–647.
215. TROTNOW, S., AL-HASANI, S., HÜNLICH, T., et al.: Bilateral tubal pregnancy following in vitro fertilisation and embryo transfer. *Arch. Gynec.*, 234, 1983, s. 75–78.
216. TROUNSON, A. O., MOHR, L.: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 335, 1983, s. 707–709.
217. TROUNSON, A. O., PEURA, A., KIRBY, C.: Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo preservation. *Fertil. Steril.*, 48, 1987, s. 843–846.
218. TROUNSON, A. O., SJÖBLÖM, P.: Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. *Fertil. Steril.*, 50, 1988, s. 373–375.
219. TROUNSON, A. O., WOOD, C., LEETON, J.: Freezing of human embryos: An ethical obligation. *Med. J. Aust.*, 2, 1982, s. 332–334.
220. TROUNSON, A. O.: Preservation of human eggs and embryos. *Fertil. Steril.*, 46, 1986, s. 1–12.
221. TSIRIGOTIS, M., YANG, D., REDGMENT, C. J., et al.: Assisted fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 62, 1994, s. 781–785.
222. TUCKER, M. J., WRIGHT, G., MORTON, P. C., et al.: Practical evaluation and application of direct intracytoplasmic sperm injection for male factor and idiopathic fertilization failure infertilities. *Fertil. Steril.*, 63, 1995, s. 820–827.
223. VAUTHIER-BROUZES, D., LEFEBVRE, G., LESOURD, S., et al.: How many embryos should be transferred in in vitro fertilization? *Fertil. Steril.*, 62, 1994, s. 339–342.
224. VENTRUBA, P., ŽÁKOVÁ, J., ADLER, J., et al.: Prodloužená kultivace lidských embryí: srovnání kokultivace na lidských tubárních epitelích a kultivace v syntetickém mediu. *Čes. Gynec.*, 61, 1996, s. 351–357.
225. VOGT, P.: Genetic aspects of human infertility. *Int. J. Androl.*, 18, 1995, s. 3–6.
226. VOLUNTARY LICENCING AUTHORITY: The second report of the Voluntary Licencing Authority for human in vitro fertilization and embryology. London, VLA 1987.
227. WANG, X. J., et al.: The contribution of embryo cryopreservation to in vitro fertilization/gamete intra-Fallopian transfer: 8 years experience. *Hum. Reprod.*, 9, 1994, s. 103–109.

228. WEIR, N. C., HENRICKS, C. H.: The reproductive capacity of an infertile population. *Fertil. Steril.*, 20, 1969, s. 289–298.
229. WEST, P. C.: Age and infertility. *Brit. Med. J.*, 294, 1987, s. 853–854.
230. WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P., MAZUR, P.: Survival of mouse embryos frozen to  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-269\text{ }^{\circ}\text{C}$ . *Sci.*, 178, 1972, s. 411.
231. WHITTINGHAM, D. G.: Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233, 1971, s. 125–126.
232. WIEMER, K., AMBORSKI, G., DENNISTON, R., et al.: Use of hormone treated fetal uterine fibroblast monolayer for in vitro development for bovine embryos. *Theriogenol.*, 27, 1987, s. 294–299.
233. WILEY, L. M., AYAMAMI, S., MUYDEN, D. van: Effect of potassium concentration, type of protein supplementation and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil. Steril.*, 45, 1986, s. 111–119.
234. WINSLOW, K. L., TONER, J. P., BRYSKI, R. G., et al.: The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test: a sensitive predictor of performance in the flare-up in vitro fertilization cycle. *Fertil. Steril.*, 56, 1991, s. 711–717.
235. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3. ed. New York, Cambridge Univ. Press 1992.
236. WRIGHT, G., WIKER, S., ELSNER, C.: Observation of the morphology of pronucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 5, 1990, s. 109–115.
237. YANAGIMACHI, R., YANAGIMACHI, H., ROGERS, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15, 1976, s. 471–476.
238. YANAGIMACHI, R.: Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.*, 10, 1984, s. 187–232.
239. YOSHIMURA, Y., HOSOI, Y., ATLAS, S. J.: Effect of exposure of intrafollicular oocytes to clomiphene citrate on pregnancy in the rabbit. *Fertil. Steril.*, 50, 1988, s. 153–159.
240. YOVICH, J. L., STANGER, J. D.: The limitation of IVF from males with severe oligospermia and abnormal semen morphology. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1, 1984, s. 172–179.
241. YOVICH, J. L., STANGER, J. O., YOVICH, J. M.: Management of oligospermic infertility by IVF. *A. NY Acad. Sci.*, 442, 1985, s. 311–323.
242. YOVICH, J. L.: Assisted reproduction for male factor infertility. In: BRINSDEN, P., RAINBURY, P. A. (Eds): A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction.
243. ZEILMAKER, G. H., ALBERDA, A. T., GIENST, I. van, et al.: Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil. Steril.*, 42, 1984, s. 293–296.
244. ZEILMAKER, G. H., RIJKMANS, C. M. P. M.: Experience with the hamster test in a IVF laboratory. In: AITKEN, R. J.: The zona-free hamster oocyte penetration test and the diagnosis of male infertility. *Int. J. Androl.*, 6, 1986 (suppl.), s. 142–146.

# AUTOR

## **MUDr. Tonko Mardešić, CSc. (\* 1955)**

Lékařskou fakultu UK v Praze absolvoval v roce 1980, kdy nastoupil na gynekologicko-porodnické oddělení nemocnice v Berouně. Od roku 1985 působil v Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze a od roku 1996 je vedoucím lékařem Sanatoria Pronatal.

Jeho hlavním odborným zájmem je asistovaná reprodukce. Získal hodnost kandidáta lékařských věd (1989), zúčastnil se zahraničních stáží v Německu (Mnichov 1992, Hamburk 1993) a Anglii (Cambridge-Bourn Hall 1994). Od roku 1991 se věnuje postgraduální a od roku 1992 i pregraduální výuce.

Publikoval 43 odborných prací v domácích a 7 v zahraničních periodických, přednesl více než 50 sdělení na domácích a 19 na zahraničních vědeckých setkáních. Je autorem publikace *Nepłodnost* (Makropulos, 1996).

Je členem *České gynekologické a porodnické společnosti* (člen výboru a předseda sekce asistované reprodukce), *Evropské společnosti pro lidskou reprodukci a embryologii (ESHRE)* a *Americké společnosti pro reprodukční medicínu (ASRM)*. Je rovněž členem komise Ministerstva zdravotnictví ČR pro in vitro fertilizaci.