

# Metody asistované reprodukce – aktuální stav a perspektivy

## Assisted reproductive methods – current status and perspectives

Chmel R. jr., Čekal M.

Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha,  
přednosta doc. MUDr. R. Chmel, Ph.D.

### ABSTRACT

**Objective:** Evaluation of the development of assisted reproduction methods and their success from the time of their origin to the present.

**Design:** Review article.

**Setting:** Department of Obstetrics and Gynaecology, Second Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague.

**Methods:** Literature search using the Web of Science, Google Scholar and PubMed databases with keywords (assisted reproduction, in vitro fertilization, infertility, ICSI, ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS, uterine transplantation) and analysis of articles published in impact and reviewed journals.

**Results:** At present children born using assisted reproduction methods are not considered as a miracle of modern medicine, but as a more difficult way of human reproduction. Reproductive medicine helps to fulfill the desires of infertile couples for their own child and thus improve the quality of their life. Since its introduction into clinical practice it has made extraordinary progress. Robert Edwards and Patrick Steptoe, thanks to systematic scientific research and clinical work, contributed to the birth of the first „test tube“ baby in 1978. Edwards received the 2010 Nobel Prize in Physiology and Medicine for his discoveries in the field of assisted reproduction. The first child of assisted reproduction in the Czech Republic was born in 1982 in Brno. In 1986, the world's first cryoembryotransfer was

performed. 1990 was the beginning of preimplantation genetic examination. In 1992, the first pregnancy was achieved using intracytoplasmic sperm injection. The work of specialists in reproductive medicine results in more than 8 million births worldwide.

**Conclusion:** Despite the fact that around 4000 children are born in the Czech Republic each year using assisted reproduction methods, its methods are rejected by part of the society. Assisted reproduction brings a number of controversies, but the spread of information smog around it should not suppress a rational view of the professional and general public. Indications for assisted reproduction vary, often are on the male side, but the age of the infertile woman is the most important determinant of the success of the process. The question is whether the continuous improvement of medical technologies and scientific discoveries threatens to inadequate manipulation of human gametes or embryos. The society should monitor these controversial aspects through its legislative and control mechanisms and ensure that these methods are not misused for other than strictly medical purposes.

### KEYWORDS

assisted reproduction, in vitro fertilization, IVF, infertility, ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS, uterine transplantation

### SOUHRN

**Cíl studie:** Zhodnocení vývoje metod asistované reprodukce a jejich úspěšnosti od doby vzniku po současnost.

**Typ studie:** Přehledový článek.

**Název a sídlo pracoviště:** Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha.

**Metodika:** Literární rešerše s využitím databází Web of Science, Google Scholar a PubMed podle klíčových slov (assisted reproduction, in vitro fertilization, infertility, ICSI, ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS, uterine transplantation) a analýza článků publikovaných v impaktovaných a recenzovaných časopisech.

**Výsledky:** V současnosti nejsou děti narozené s využitím metod asistované reprodukce přijímány jako zázrak moderní medicíny, ale jako náročnější způsob lidské reprodukce. Reprodukční medicína napomáhá plnit touhy neplodných párů po vlastním dítěti, a zlepšovat tím kvalitu jejich života. Od uvedení do klinické praxe zaznamenala mimořádný rozvoj. Robert Edwards a Patrick Steptoe se díky systematické vědecko-výzkumné a klinické práci zasloužili o narození prvního „dítěte ze zkumavky“ v roce 1978. Za objevy na poli asistované reprodukce obdržel Edwards v roce 2010 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. První dítě z asistované reprodukce na území České republiky se narodilo v roce

1982 v Brně. V roce 1986 byl ve světě proveden první kryoembryotransfer. Rok 1990 byl začátkem preimplantačního genetického vyšetření. V roce 1992 bylo dosaženo prvního těhotenství s využitím intracytoplazmatické injekce spermií. Výsledkem práce specialistů v reprodukční medicíně je více než osm milionů dosud narozených dětí na celém světě.

**Závěr:** Navzdory faktu, že se každý rok narodí v České republice okolo 4000 dětí s využitím metod asistované reprodukce, jsou její metody částečně společnosti odmítány. Asistovaná reprodukce s sebou přináší řadu kontroverzí, nicméně kolem ní se šíří informační smog by nemělo potlačit racionální náhled odborné i laické veřejnosti. Indikace k asistované reprodukci se liší, často jsou i na mužské straně, ale věk neplodné ženy je nejpodstatnější

determinantou úspěšnosti celého procesu. Otázkou zůstává, zda díky kontinuálnímu zkvalitňování medicínských technologií a vědeckým objevům nehrozí neadekvátní manipulace s lidskými gametami či embryi. Společnost by měla svými legislativními a kontrolními mechanismy tyto kontroverzní aspekty monitorovat a zajistit, aby se tyto metody nezneužívaly pro jiné než přísně medicínské účely.

#### KLÍČOVÁ SLOVA

**asistovaná reprodukce, in vitro fertilizace, IVF, infertilita, ovariální hyperstimulační syndrom, OHSS, transplantace dělohy**

MUDr. Roman Chmel jr., e-mail: roman.chmel2@fnmotol.cz  
Čes. Gynek., 2020, 85, č. 4, s. 244–253

## ÚVOD

Plodnost je schopnost reprodukce a je základním předpokladem udržení života na Zemi. Neplodnost (infertilita) je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) definována jako stav, kdy žena nedosáhne těhotenství po jednom roce pravidelných nechráněných pohlavních styků. V rozvinutých zemích se to týká až 15 % párů [15]. Okolo 50 % párů dosáhne těhotenství do tří měsíců pravidelného nechráněného styku. Tři čtvrtiny žen otěhotní do šesti měsíců, do jednoho roku pak 85 % žen. Podle recentních údajů z roku 2019 dosáhl průměrný věk prvorodičky v České republice (ČR) 28,2 let [43]. Ženy v současnosti často upřednostňují studium a budování osobní profesní kariéry, přičemž plánování rodiny a těhotenství odkládají do pozdějšího věku [43]. Vyšší věk představuje nepříznivý rizikový faktor nemožnosti otěhotnění z důvodu reprodukčního stárnutí ženy i muže [47]. U žen ve věku vyšším než 35 let exponenciálně roste riziko nondisjunkčních chromozomových aberací a je vhodné zahájit vyšetření plodnosti po 4–6 měsících neúspěšné snahy o těhotenství. Nejvíce cyklů asistované reprodukce (AR) podstupují ženy mezi 30. a 39. rokem věku. Poté v ČR zájem klesá, z části i kvůli věkové hranici pro úhradu ze zdravotního pojištění.

AR definujeme jako soubor postupů a metod, při kterých jsou pohlavní buňky zpracovávány mimo lidský organismus a následně opět ve formě gamet nebo již jako embrya přeneseny do těla ženy.

Po narození prvního dítěte počatého pomocí metody in vitro fertilizace (IVF), Louisy Brownové v roce 1978 ve Velké Británii, vznikla nová medicínská disciplína, která významně ovlivnila životy neplodných párů a dala jim šanci mít geneticky

vlastní potomky. Alternativními formami AR jsou surogátní (náhradní) těhotenství geneticky vlastního dítěte (v ČR právně nevymezené) a adopce.

Robert Edwards, hlavní otec myšlenky IVF, byl za svou systematickou práci v oboru reprodukční medicíny oceněn v roce 2010 Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu [23]. Edwards a jeho tým však stavěli na poznatcích svých předchůdců, přičemž humánní reprodukční medicína byla postavena na základech získaných v medicíně veterinární [2].

Od roku 1978 se podle rešerše European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) ve světě narodilo více než osm milionů dětí pomocí metod AR [17]. Původně byla AR určena především ženám s tubárním faktorem infertility. Indikace k použití asistované reprodukce se do současnosti rozšířily mimo jiné o mužské, ovariální, děložní, imunologické, genetické faktory či endometriózu.

Za více než 40 let se celý proces AR stal významně bezpečnější a efektivnější. V rozvinutých zemích se rodí okolo jednoho procenta všech dětí po mimotělním oplodnění [42]. Reprodukce touto cestou však s sebou nese řadu etických otázek.

## ZAČÁTKY VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ A LÉČBA NEPLODNOSTI DO VZNIKU ASISTOVANÉ REPRODUKCE

Před moderní érou AR se předpokládalo, že hlavní příčinou neplodnosti jsou z různých důvodů nefunkční vejcovody. V polovině 19. století proto byly vyvinuty chirurgické techniky zprůchodňující vejcovody. Například v roce 1849 Tyler Smith použil kosticový dilatátor k roztažení tub s adhezemi [2]. Tyto metody však nikdy nebyly úspěšně zavedeny do klinické praxe.

První historické zmínky o animální IVF se datují do konce 19. století. V roce 1890 Walter Heape úspěšně přenesl oplozené savčí oocyty. Odebral dvě vajíčka angorského králíka, která byla 32 hodin před odběrem oplodněna spermii angorského králíčího samce. Tato vajíčka byla přenesena do vejcovodu belgického zajíce, který sám byl oplodněn samcem vlastního druhu tři hodiny před tímto transferem. Výsledkem bylo šest mláďat, dva angorského a čtyři belgického fenotypu. Angorský králík se vyznačuje dlouhou hedvábnou srstí a tato dvě mláďata byla albíny, stejně jako jejich biologičtí rodiče [2].

Během následujících šedesáti let byl tento první krok k AR následován řadou vědců, kteří úspěšně dosáhli březosti u různých živočišných druhů, od myši až po krávy. První úspěšná in vitro fertilizace byla provedena u oocytů králíka v roce 1959 (Chang), následována oocyty křečka (Chang) a myši (Whittingham) [2].

### POSTUPY ASISTOVANÉ REPRODUKCE V MINULOSTI

V polovině 20. století se u tehdy začínajícího britského fyziologa Roberta Edwardse rozvinul zájem o reprodukční medicínu. Zabýval se výzkumem meiózy, ovulace, fertilizace, dělení embryí, implantace a fetálního vývoje u myši. Poznatky získané u zvířat chtěl Edwards aplikovat i v humánní medicíně. V té době se však předpokládalo, že u lidí nebude možné in vitro fertilizaci provést. Z pohledu humánní aplikace metod AR byla důležitá jeho spolupráce s gynekologem Patrickem Steptoe, za kterým pravidelně dojížděl z Cambridge do Oldhamu v Lancashire. Steptoe byl průkopníkem laparoskopie a byl schopen získat transabdominální aspiraci během laparoskopické operace oocyty potřebné k výzkumu. Edwards využíval laboratorní zkušenosti k jejich oplodnění ve zkumavce a studiu dělicího se embrya. Kooperace mezi gynekology a embryology byla a stále zůstává jednou ze stěžejních podmínek úspěšné AR. Každý z následujících kroků byl v průběhu dekád experimentálně vylepšován a vedl ke kvazi-industrializaci metod asistované reprodukce do podoby, jak ji známe dnes.

#### Předpokládaných pět kroků k úspěšné asistované reprodukci:

1. Odběr dostatečně zralých oocytů.
2. Získání spermii s proběhlou akrozomovou reakcí.
3. Zajištění média pro samotnou in vitro fertilizaci.
4. Přenos embrya do dělohy.

5. Podpora implantace embrya a jeho udržení v děloze.

Stěžejním problémem začátků Edwardsova počínání byl nedostatek oocytů pro výzkum. Přírozenou cestou bez hormonální stimulace byl jeho tým schopen od pacientky získat jedno až dvě vajíčka a často byl oocyt ztracen kvůli předčasně ovulaci. I proto byla úspěšnost celého procesu na počátku nízká. Embryologové vyžadovali více vajíček a gynekologové potřebovali jistotu, že neproběhne předčasná ovulace. Mezi roky 1950 a 1960 se Edwards zabýval i studiem dozrávání oocytů in vitro a popsal časový vývoj vajíčka od jeho uvolnění přes jednotlivé kroky maturace až do stadia úplné zralosti. V roce 1965 spojil síly s americkými gynekology Georgannou a Howardem Jonesovými z John Hopkins Hospital v Baltimore (Maryland, USA), kde společně provedli první úspěšnou in vitro fertilizaci lidského oocytu [22].

Převratným krokem bylo vytvoření specifického média pro IVF a vlastní dělení embrya. Fertilizované oocyty byl pěstovány v různých médiích ke zjištění přesných podmínek nutných k vývoji embrya in vitro. Důraz byl kladen zejména na stanovení rozmezí optimálního pH roztoku, osmotického tlaku a přítomnost specifických prvků v médiu. Podstatným pokrokem bylo využití Bavisterova média s vysokým pH, případně různě modifikovaného média Earlova nebo Tyrodova [2]. Metabolické potřeby embrya jsou zcela odlišné od potřeb buněk somatických. Primárním zdrojem energie embrya jsou totiž pyruvát a laktát, ne glukóza. Studie také ukázaly, že stěžejním faktorem vývoje buněk zárodku je přítomnost určitých aminokyselin. Média využívaná v současnosti obsahují specifické koncentrace aminokyselin, glukózy, amoniaku a chelátorů, jako EDTA (kyselina ethylen-diamintetraoctová) [24].

Přenos embrya do dělohy představoval další z dosud nezodpovězených otázek. Díky ne zcela dokonalé technice ve výzkumu často došlo k vyprovokování kontrakcí děložního svalstva, které vedly k odloučení dosud neimplantovaných embryí. Edwards proto navrhl katétry k přenosu zárodků, využívající nejmenší nutné množství média, čímž současně i výrazně minimalizoval nežádoucí předčasnou deciduální reakci.

### PRVNÍ DÍTĚ PO IVF

Edwards a spol. otevřeli v roce 1970 centrum asistované reprodukce jako součást nemocnice v britském Oldhamu, a to i přes neúspěšnou snahu získat finanční podporu od Rady pro lékařský výzkum (Medical Research Council). Edwards předpokládal, že čím více oocytů bude neplodné

ženě odebráno, tím vyšší by měla být šance na otěhotnění. Neplodným dobrovolnicím byl aplikován lidský menopauzální gonadotropin (human menopausal gonadotropin, hMG) 2–3krát denně každý třetí den v průběhu folikulární fáze menstruačního cyklu a lidský choriový gonadotropin (human chorionic gonadotropin, hCG) mezi desátým a dvanáctým dnem menstruačního cyklu [50]. Konečným cílem bylo navodit zrání mnoha oocytů, které byly 30–36 hodin po aplikaci hCG laparoskopicky odebrány.

Pro odběr oocytů, implantaci embrya a jeho udržení v děloze bylo nutné správně pochopit fyziologické hormonální regulace během menstruačního cyklu a v těhotenství. Zdokonalení celého procesu přineslo monitorování hladiny luteinizačního hormonu (LH) v moči pacientek. To umožnilo správně načasovat odběr oocytů v době, kdy nebylo standardně k dispozici ultrazvukové vyšetření.

Navzdory etickým kontroverzím, nedůvěře k novátorství a rozmanité odborné i laické kritice dosáhl Edwardsův tým v roce 1976 prvního těhotenství po IVF. Bohužel se jednalo o ektopickou tubární graviditu [2].

Lesley Brownová byla druhou ženou, která podstoupila léčbu v režimu přirozeného menstruačního cyklu bez předchozí hormonální stimulace. Laparoskopicky byl z jejího ovaria odebrán jediný oocyt, který byl fertilizován a ve snaze minimalizovat čas in vitro byl přenesen do dělohy v momentě, kdy bylo dosaženo stadia osmi buněk. 1. července 1978 se stal významným dnem nejen v životě Roberta Edwardse a Patricie Steptoea, ale zejména oboru reprodukční medicíny a potažmo i celého lékařství. „Je těžké vyjádřit slovy, co narození Louise Brownové znamená po mě a náš úžasný tým,“ řekl tehdy Robert Edwards. Povzbuzeni svými úspěchy založili oba výzkumníci v roce 1980 první centrum asistované reprodukce Bourn Hall Clinic nedaleko Cambridge. Gynekologové a embryologové z celého světa zde byli vzděláváni a do roku 1986 se zde narodilo 1000 dětí, což představovalo zhruba polovinu všech dětí do té doby narozených po IVF [50].

Další desetiletí přinesla značný posun v AR. Začátkem 90. let 20. století byla použita kryoprezervace embryí. V roce 1985 bylo potvrzeno první těhotenství s použitím spermií získaných aspirací z nadvarlete (metoda MESA) a rozvinula se i metoda TESE (extrakce spermií ze zárodečného epitelu varlete). Byla vytvořena dokonalejší média pro buněčnou kulturu napodobující in vivo prostředí, kterému jsou embrya přirozeně vystavena v děloze. V roce 1985 bylo popsáno první surogátní těhotenství po IVF [30]. Velmi důležitým mezníkem bylo první těhotenství ženy po metodě ICSI (intracytoplasmatic sperm injection) v roce 1992 [33].

## HISTORIE ASISTOVANÉ REPRODUKCE NA ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY

Pozadu nezůstala ani česká vědecká obec. V návaznosti na úspěch ve světě byl ve Fakultní nemocnici v Brně v roce 1978 zahájen program IVF/ET (in vitro fertilizace/embryo transfer). První dítě počaté metodami asistované reprodukce v bývalé východní Evropě se narodilo v Brně 4. listopadu 1982 [44]. Úspěch byl zásluhou spolupráce brněnského týmu Katedry histologie a embryologie LF Masarykovy univerzity (MU), vedené profesorem M. Dvořákem, a 1. gynekologicko-porodnické kliniky LF MU pod vedením profesora L. Pilky. Těhotenství dosáhli technikou OIVI-TT (oocyte in vitro insemination and tubal transfer; také GIFT – gamete intrafallopian transfer), která byla v roce 1991 uznána jako jedna z metod AR [13]. Dne 29. října 1984 bylo na tomto pracovišti porozeno první dítě po metodě IVF na území Československa [35].

## ZDOKONALOVÁNÍ METOD AR DO SOUČASNOSTI

### Ovariální stimulace a kontrola cyklu

V případě prvního úspěšného těhotenství a porodu Louise Brownové bylo využito monitorace přirozeného ovulačního cyklu bez stimulace ovarii [3]. Až později se stala hormonální stimulace vaječníků vedoucí k nadprodukcí oocytů součástí IVF. Kontrolovaná ovariální hyperstimulace s použitím gonadotropinů získaných z moči postmenopauzálních žen byla poprvé použita Georgannou a Howardem Jonesovými v USA, a současně i Alanem Trounsonem v Austrálii [45].

Léčba gonadotropiny započala novou éru v oboru reprodukční medicíny. Folikuly stimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) s následnou aplikací hCG vystaví folikuly nefyziologicky vysokým hladinám hormonů, které zajistí jejich mnohočetný vývoj a zrání oocytů. To umožňuje získat během jednoho cyklu průměrně deset vajíček.

Při indukci folikulogeneze gonadotropiny se v 0,5–11 % cyklů rozvíjí ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS) [13]. Přesná etiologie tohoto stavu není známa. Dochází k mohutné extravazaci a kumulaci tekutiny v třetím prostoru (ascites, pleurální výpotky, anasarca), následované dehydratací, hemokoncentrací a elektrolytovou dysbalancí. Predikce rizika rozvoje OHSS na základě identifikace primárních a sekundárních rizikových faktorů je základem pro individualizaci stimulačního protokolu u jednotlivých pacientek podstupujících IVF cyklus [19].

Znalost změn hladin hormonů během menstruačního cyklu umožnila celý proces IVF zefektivnit.

Ovulace nastává 24–36 hodin po vzestupu hladiny luteinizačního hormonu 14. den menstruačního cyklu [12]. Využití agonistů gonadotropin-releasing hormonu (GnRH-agonisté) vede k iniciálnímu vzestupu FSH a LH, ale posléze k downregulaci receptorů a snížení jejich produkce na základě negativní zpětné vazby. GnRH-agonisté byli použiti k potlačení vzestupu LH v IVF cyklech. To umožnilo dosáhnout většího počtu folikulů, lépe načasovat jejich odběr, a zejména zabránit předčasné ovulaci.

Na přelomu druhého a třetího tisíciletí se do praxe dostali antagonisté gonadotropin-releasing hormonu (GnRH-antagonisté). GnRH-antagonisté mají ve výsledku stejný, ale okamžitý efekt na hormonální produkci na základě blokády na úrovni hypotalamu.

### **Odběr oocytů a uchování embryí**

Laparoskopický odběr oocytů představoval poměrně velkou zátěž pro pacientky. Lenz a Lauritsen v roce 1982 provedli odběr oocytů transabdominální cestou pomocí ultrazvukově navigované odběrové sondy [25]. Metoda transvaginálního odběru vajíček pod ultrazvukovou kontrolou se objevila až začátkem devadesátých let 20. století. Výkon se tak stal méně invazivním a je dodnes zlatým standardem procedury IVF. Komplikace (krvácení, infekce aj.) spojené s odběrem transvaginální cestou jsou vzácné.

Při odběru většího množství oocytů a po jejich oplození se nadpočetná embrya kryoprezervují k použití v budoucnu. V tekutém dusíku jsou zárodky vystaveny teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . První kryoprezervace spermii proběhla roku 1954 [4]. První těhotenství s užitím zmrazených embryí a kryoembryotransferu bylo zaznamenáno v roce 1986 [20].

Stěžejním zůstávalo eliminovat poškození embrya, ke kterému může dojít vznikem intracelulárních jehliček ledu, které mohou porušit vyvíjející se buňky. Současně bylo nutné buňky nepoškodit při následném rozmrazení. Existují dvě metody kryoprezervace, které našly uplatnění v praxi. První je *slow-freezing*. Ta využívá pomalé zmrazování pomocí nízkých koncentrací kryoprotektantů (glycerol, propandiol), které nahrazují intracelulární vodu v buňkách embrya, čímž se významně snižuje riziko vzniku krystalů ledu uvnitř buněk. Druhou možností je metoda vitrifikace, která je založena na využití vysokých koncentrací kryoprotektantů a extrémně rychlém zmrazení. Současné statistiky ukazují, že vitrifikace představuje bezpečnější metodu v porovnání se *slow-freezing* technikou [26]. Existují však určité obavy z toxicity použitých látek [39].

### **ASISTOVANÁ FERTILIZACE A MIKROMANIPULAČNÍ TECHNIKY**

Metodami asistované fertilizace, které mají význam v klinické praxi dodnes, jsou intracytoplazmatická injekce spermii (ICSI) a asistovaný hatching.

#### **Intracytoplazmatická injekce spermii (ICSI)**

K trvalému zvyšování úspěšnosti metod AR přispívá i mikromanipulační metoda ICSI. Využívá se u gamet se sníženým fertilizačním potenciálem. Jedna vybraná spermie je zavedena přímo do oocyty, čímž se obchází kapacitace a akrozomová reakce. První žena úspěšně otěhotněla po ICSI v roce 1992. Dnes je ICSI využívána u většiny cyklů IVF, například v USA podle dostupných informací proběhlo v roce 2018 více než 90 % všech IVF cyklů s využitím ICSI [30].

#### **Asistovaný hatching**

Nidace embrya je založena na jeho interakci s endometriem dělohy. Při tomto ději buňky formující placentu přecházejí přes zona pellucida blastocysty. V roce 1990 provedl Cohen před transferem do dělohy incizi v zona pellucida ve snaze pomoci embryu se zahnížit [5]. Během následujících let bylo vyzkoušeno několik metod k vytvoření otvoru v zona pellucida, například mechanicky, chemicky nebo laserem. Právě využití laseru je v současnosti považováno za nejbezpečnější a nejméně invazivní formu asistovaného hatchingu [27].

Asistovaný hatching má význam zejména u neplodných žen ve vyšším věku (zona pellucida se s rostoucím věkem stává tužší), v případě opakovaného selhání implantace a při transferech embryí po kryoprezervaci [27].

### **PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ VYŠETŘENÍ**

Pomocí jedné nebo více buněk odebraných z vyvíjejícího se zárodku je možné vyšetřit genetickou výstavbu embrya a zaměřit se na specifické mutace genů (PGT-M – vyšetření monogenních chorob) či prozkoumat jednotlivé chromozomy v buňce (PGT-A – vyšetření aneuploidii, PGT-SR – vyšetření strukturálních aberací).

Počátek preimplantačního vyšetření se datuje do roku 1990, kdy Handyside provedl genetické vyšetření před implantací u páru se zvýšeným rizikem vzniku adrenoleukodystrofie a X-vázané mentální retardace u plodu [16]. Potvrzením genetického podkladu řady chorob (např. retinoblastomu, cystické fibrózy, spinální muskulární atrofie aj.) a současným zdokonalováním metod genetického vyšetření se preimplantační testování

v indikovaných případech stalo nedílnou součástí IVF protokolu. Díky kontinuálnímu vědeckému vývoji je však možné, že v blízké budoucnosti bude možné získat „embryo na zakázku“. Je proto nezbytná legislativní úprava této oblasti, se kterou se pojí mnoho etických, společenských i náboženských kontroverzí.

Studie ukazují, že existují významné rozdíly v metabolismu normálního a abnormálního embrya [41]. Detekce produktů metabolismu buněk a využití metabolomiky v rámci preventivního vyšetření představuje signifikantní posun v predikci pravděpodobnosti otěhotnění (pregnancy rate) v tomto stadiu vývoje embrya na jiném než morfoloickém základě.

Preimplantační diagnostika by měla pomáhat zejména pacientům s rizikem přenosu genetických chorob. Preimplantační vyšetření z jiného důvodu, jako je například volba pohlaví, je kontroverzní, a také právě proto je v řadě zemí zakázáno [17].

### EMBRYOTRANSFER A CESTA K PŘENOSU JEDNOHO ZÁRODKU

Před zavedením zmrazování embryí do rutinní praxe v roce 1984 byla získána embrya v rámci cyklu všechna transferována do dělohy s cílem zvýšit pravděpodobnost otěhotnění.

Počet transferovaných embryí během cyklu AR je dlouhou dobu předmětem diskusí. Nezpochybnitelným faktem přenosu většího množství zárodků současně je riziko vzniku mnohočetného těhotenství. To s sebou nese řadu rizik pro těhotnou ženu i plody. Při mnohočetné graviditě je těhotná žena vystavena vyššímu riziku výskytu preeklampsie, gestačního diabetu, častěji se může objevit antepartální krvácení z důvodu abrupce placenty či včestného lůžka a zvyšuje se i pravděpodobnost operačního ukončení těhotenství. Fetální komplikace jsou spojeny s následky předčasného porodu, nízkou porodní hmotností a obtížnější poporodní adaptací. Vyšší je tak nejen novorozenecká morbidita, ale i mortalita.

V roce 2000 ESHRE deklarovala, že až 25 % těhotenství vzniklých s využitím metod AR je dvoučetných a že tak vysoké číslo je nepřijatelné. Cílem bylo snížit incidenci dvoučetných těhotenství na 10 % a eliminovat těhotenství trojčetná a vícečetná. „Get the number of babies you want, but one at a time,“ znělo heslo. V konsenzu ESHRE z roku 2001 je deklarováno, že úspěch AR optimálně spočívá v narození jednoho zdravého dítěte.

Současným trendem je tzv. elective single embryo transfer (eSET) s cílem redukovat počet mnohočetných těhotenství a jejich možných komplikací, současně však zachovat procento dosaže-

ných gravidit. Podstatou eSET je selektovat taková embrya, která mají vyšší šanci na implantaci a další vývoj. Právě identifikace embryí s vyšším potenciálem k uchycení je a bude primárním cílem ve výzkumu a cestě k úspěšným těhotenstvím s pomocí metod AR. Selektce je dána kromě jiného preimplantačním genetickým testováním aneuploidii.

Transfer jednoho selektovaného embrya, který je v případě neúspěšné koncepce následován přenosem dalšího zmrazeného embrya v navazujícím cyklu, dosahuje stejné celkové úspěšnosti otěhotnění jako transfer více embryí současně s výhodou eliminace vícečetných gravidit. Tuto skutečnost podpořili ve své studii Shapiro et al., kteří upozornili na nedostatečnou receptivitu endometria při čerstvých IVF cyklech následkem medikamentů užívaných ke kontrolované ovariální hyperstimulaci působících současně i na děložní sliznici. Tato americká studie demonstrovala vyšší úspěšnost otěhotnění u cyklů používajících zmrazená embrya v sekvenčních embryotransferech v porovnání s cykly užívanými embrya čerstvá [38].

Ve srovnání s ostatními součástmi metod asistované reprodukce samotný embryotransfer (ET) doznal během vývoje pouze relativně málo vylepšení. Embrya jsou přenášena do dělohy pomocí **speciálních katétrů**. Existují dva typy katétrů – měkké a rigidní. Za stěžejní krok je považována opatrná manipulace s katétreem ve snaze nekontaktovat děložní fundus. Embryotransfer probíhá pod ultrazvukovou kontrolou a za ideální se považuje stav, kdy se konec katétru nachází ve vzdálenosti 5–27 mm od děložního fundu. Za těchto podmínek je vyšší pravděpodobnost otěhotnění a zároveň nižší výskyt mimoděložních těhotenství [36]. Přenos embrya blíže k děložnímu fundu je spojen s rizikem traumatu endometria s vyvoláním děložních kontrakcí. U transferu do nižších částí dělohy, tj. blíže k děložnímu hrdlu, tato rizika odpadají, avšak je zde vyšší pravděpodobnost cervikální implantace embrya. Poslední guidelines American Society for Reproductive Medicine (ASRM) založené na kontrolovaných a kohortových studiích dokládají, že lokalizace katétru při transferu zásadně ovlivňuje úspěšnost implantace [37].

Studie posledních let se také zaměřily na **kvalitu médií** užívaných při ET. Metaanalýza Cochrane Collaboration, která hodnotila 16 nezávislých studií, prokázala benefit suplementace média látkami zvyšujícími adheenci embryí (hyaluronan v množství 0,5 mg/ml aj.). Toto opatření může navýšit procento klinických těhotenství [49]. Infuze hCG do děložní dutiny krátce před zahájením ET s cílem zvýšení úspěšnosti implantace nebyla efektivní [6].

Při přenosu embryí do dělohy je důležitý krátký časový interval mezi vynětím embryí z inkubátoru a jejich uvolněním do děložní dutiny. Doba, kdy jsou embrya mimo inkubátor, je kritická z důvodu environmentálního stresu působícího na zárodky. Matorras et al. poukázali, že pokud je tato doba delší než 120 sekund, pravděpodobnost otěhotnění (pregnancy rate) klesá z 31,6 % na 19,1 % a pravděpodobnost implantace (implantation rate) se snižuje z 15,9 % na 9,4 % [29].

Lze tedy konstatovat, že optimální ET spočívá v atraumatickém a rychlém zavedení měkkého katétru do děložní dutiny pod ultrazvukovou kontrolou a vhodném umístění embrya.

### PROBLEMATIKA VÍCEČETNÝCH TĚHOTENSTVÍ

Zajímavý matematický pohled na aktuální situaci asistované reprodukce v USA přinesla ASRM, která za limitující krok označuje **implantaci embrya** (EI – embryo implantation) [34]. Matematickým vzorcem vyjadřuje, že implantace zárodku je závislá na jeho kvalitě (EQ), receptivitě děložní sliznice (ER) a atraumatickém přenosu embrya (TE) [EI = EQ × ER × TE].

Ačkoliv ER i TE mají signifikantní vliv na implantaci, kvalita embrya je dominantním faktorem určujícím úspěšnost celého procesu. EQ klesá s rostoucím věkem ženy; tak lze vysvětlit i klesající celkovou pravděpodobnost otěhotnění ve vyšším věku ženy. Ve snaze vykompenzovat nižší kvalitu embryí se mnohdy navyšuje počet transferovaných zárodků, který s sebou nese riziko mnohočetné implantace.

Studie Gunnala et al. [14] se zaměřila na ženy podstupující AR po 43. roce života. Výsledkem jejich práce je tvrzení, že u žen ve věku vyšším než 43 let je bezpečné transferovat současně pět a více embryí s nízkým rizikem mnohočetného těhotenství. Autoři však přiznávají, že jejich data nejsou podložena dostatečným množstvím pacientek a ve svém finálním výroku jsou opatrní.

Z předcházejícího vzorce lze odvodit **pravděpodobnost otěhotnění** (P – probability of pregnancy) v případě, že implantaci embrya považujeme za neovlivnitelnou a nezávislou událost.

$$P = 1 - (1 - EI)^n$$

(n = počet přenesených embryí)

### Vzorec pro výpočet pravděpodobnosti mnohočetné implantace:

$$P(m) = EI^m (1 - EI)^{n-m} \times n! / [m! (n-m)!]$$

(m = četnost těhotenství, např. u dvojčat m = 2, u trojčat m = 3)

Riziko vícečetné implantace existuje i u přirozené reprodukce, otázkou zůstává, jaké množství embryí transferovat při zachování přijatelného rizika. U žen ve vyšším věku než 43 let je v USA tolerován přenos více embryí [34].

Mediálně známou se stala kauza z roku 2009 v Los Angeles (USA), kdy žena porodila osmerčata, která vznikla po transferu šesti kryoprezervovaných embryí, z nichž se dvě rozdělila a dala vzniknout jednovaječným dvojčatům. Tento případ se stal katalyzátorem diskusí ohledně klinických a etických rozhodnutí v rámci AR. V USA centra AR odesílají procentuální úspěšnost implantace a těhotenství do národního registru Society for Assisted Reproductive Technology (SART). V roce 2007 inkriminované centrum AR z Los Angeles publikovalo u svých cyklů úspěšnost implantace u žen ve věku nižším než 35 let ve výši 3 %. Pokud bychom se na danou situaci podívali opět matematickým pohledem, kdy tedy má každé embryo 3% šanci na uchycení a je zde 2% pravděpodobnost vzniku dvoučetného těhotenství, pak pravděpodobnost implantace osmi zárodků současně je dána vzorcem  $(0,03 \times 0,03 \times 0,03 \times 0,03 \times 0,03 \times 0,03 \times 0,02 \times 0,02)$ , což se rovná 1:3,4 bilionu [32].

### NEJČASTĚJŠÍ INDIKACE ASISTOVANÉ REPRODUKCE

Mužský a ženský faktor se podílí na neplodnosti přibližně stejně, a to každý ve 35 %. Kombinace příčin stojí za neschopností počít dítě až ve 20 % případů. U zbylých 10 % je etiologie neznámá. Ženský faktor neplodnosti lze rozdělit na několik typů.

**Cervikální faktor** (tj. týkající se děložního hrdla) je příčinou neplodnosti v 5–10 %. Souvisí zejména s kvalitou cervikálního hlenu, která se v průběhu menstruačního cyklu mění. Tím se liší jeho prostupnost pro spermie a šance na kapacitaci. Příčinou neplodnosti však může být i stenóza cervikálního kanálu díky vrozeným vadám nebo získaná po chirurgických zákrocích či radiační léčbě.

**Uterinní faktory** se podílejí na 5 % příčin ženské neplodnosti. Vrozené vady vznikají na základě nesprávného vývoje Müllerových (parametonefrických) vývodů. Tím může vzniknout celá řada morfologických variací dělohy, které nejsou vhodné pro vývoj plodu a představují relativní uterinní faktory infertility [18]. Absolutní uterinní faktor infertility (AUF) představuje v rámci vrozených vad MRKH syndrom (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrom) spojený s agenezí dělohy a pochvy. V ČR se problematice léčby AUF věnuje klinická studie transplantace dělohy [21]. Intrauterinní adheze a synechie (Ashermanův syndrom), leiomyomy a následky chirurgických zákroků na děloze patří

mezi získané vady zodpovědné za děložní faktor infertility.

Oogeneze začíná ve vaječniku plodu v průběhu prvního trimestru těhotenství. Při narození jsou přítomny přibližně dva miliony oocytů, kolem menarche se jejich počet zredukuje na čtvrtinu a jen malá část z nich se využije během reprodukčního věku ženy. S rostoucím věkem ženy klesá nejen kvantita oocytů, ale zejména i jejich kvalita. Hlavními příčinami **ovariálního faktoru** infertility jsou hormonální (na úrovni hypotalamu a hypofýzy, ale také jiných endokrinních žláz – nadledvin, štítné žlázy) a metabolické poruchy (např. malnutrice u mentální anorexie, obezita s hyperestrinismem). Častým důvodem je také syndrom polycystických ovaríí (PCOS) a předčasné ovariaální selhání.

**Tubární a peritoneální faktor** infertility může být zapříčiněn různými vrozenými vadami nebo poruchou motility vejcovodů danou nejčastěji pozánětlivými adhezemi.

**Mužský faktor** neplodnosti se dělí na pretestikulární, testikulární a posttestikulární. Pretestikulární faktor se týká především dysfunkce osy hypotalamus-hypofýza. Testikulární příčina je spojena zejména s geneticky podmíněnými poruchami (Klinefelterův syndrom, 47, XXY). Získané poruchy varlat vznikají například následkem radiačního záření, infekce či traumatu. Častou příčinou neplodnosti muže je varikokéla. Posttestikulárně jsou za infertilitu zodpovědné narušené vývodné pohlavní cesty. Typickou vrozenou vadou je bilaterální absence vas deferens u mužů s cystickou fibrózou.

**Imunologické faktory** neplodnosti se týkají buněčné i humorální složky imunity. V rámci buněčné imunity selhává imunologická regulace a tolerance či negativně působí embryotoxické cytokiny. U humorální složky imunity nacházíme protilátky proti spermiím, trofoblastu či štítné žláze. Pár s imunologicky podmíněnou infertilitou má nižší šanci na přirozenou koncepci z důvodu narušení interakce mužských a ženských pohlavních buněk i vývoje embrya v počátečních stádiích. In vitro fertilizace v kombinaci s ICSI však poskytuje párům s poruchami fertilizace imunologického původu reálnou šanci na těhotenství.

## BUDOUCNOST A KONTROVERZE METOD ASISTOVANÉ REPRODUKCE

Odhaduje se, že více než 70 milionů párů na celém světě nemůže z různých důvodů počít dítě přirozenou cestou a jejich množství stále roste [31]. Až polovina všech IVF+ET cyklů je prováděna v Evropě [48]. V roce 2013 provedla evropská centra AR z 38 zemí přes 686 000 cyklů s úspěšností otěhotnění okolo 34,5 % [11].

Celkovou úspěšnost otěhotnění zvyšuje opakování cyklů IVF. Statisticky během šesti cyklů dosáhne těhotenství 85 % žen mladších než 35 let a 42 % žen starších než 40 let [28]. Jiné studie dokonce ukazují, že až 21 % žen otěhotní spontánně po neúspěšném cyklu IVF [7].

Preimplantační genetická vyšetření a metody asistované fertilizace zvýšily úspěšnost metod AR [46]. Umožňují transfer jednoho embrya při zachování stejné úspěšnosti a eliminují riziko vícečetného těhotenství se všemi jeho možnými komplikacemi.

Metody AR pomáhají ženám i mužům, kteří v prefertilním nebo plodném věku podstoupili chemoterapii v léčbě nádorových onemocnění. Chemoterapie je toxická pro pohlavní buňky, proto je pacientům doporučována kryoprezervace oocytů či spermií ještě před zahájením onkologické léčby. Provádí se prezervace ovariaální tkáně s její následnou reimplantací [9, 10]. Ve fázi vývoje je transplantace ovariaální tkáně s následným IVF protokolem, díky čemuž se do roku 2017 narodilo více než 70 dětí [8].

Relativně kontroverzní otázkou je kryoprezervace oocytů ženy, která je ve „fertilem nejlepším“ mladém věku, s cílem zachovat vysoký potenciál plodnosti do budoucna, a poskytnout tak ženě určitou flexibilitu a vyšší pravděpodobnost otěhotnění v případě dnes stále častějšího odkládání těhotenství do vyššího věku (tzv. social freezing) [40].

## SITUACE V ČESKÉ REPUBLICĚ

Podle poslední dostupné analýzy z roku 2017 se v ČR díky IVF narodilo v daném roce 2086 dětí, přičemž 1266 matek bylo ve věku do 34 let, 706 ve věku 35 až 39 let a 114 bylo starších než 40 let. Po kryoembryotransferu se narodilo celkem 2166 dětí, z toho 1044 ženám ve věku do 34 let, 710 bylo ve věku 35 až 39 let a 412 žen bylo více než 40 let.

Mezi roky 2007 a 2017 vzrostl počet cyklů AR ze 17 tisíc na více než 42 tisíc ročně. Podstatnou část cyklů však tvoří zahraniční klientela, která díky liberálnější české legislativě a vysoké kvalitě péče využívá služeb tuzemských center AR. V roce 2016 byla více než jedna třetina všech cyklů v ČR provedena cizinkám (35,7 %) [1].

Rostoucí množství cyklů je zapříčiněno nejen větším zájmem o AR, ale také stoupajícím počtem center poskytujících tyto služby. Na počátku nového tisíciletí bylo v ČR celkem 26 center, k roku 2019 podle posledních dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS ČR) je na našem území v provozu 43 center AR. Tato centra odesílají data o provedených metodách a jejich efektivitě do Národního registru asistované reprodukce (NRAR),



který vznikl v letech 2005–2006 v gesci Ministerstva zdravotnictví ČR a ÚZIS ČR.

## ZÁVĚR

Děti ze zkumavek nejsou v současnosti přijímány jako zázrak medicíny, ale jako o něco obtížnější způsob lidské reprodukce. I navzdory faktu, že se každý rok narodí v České republice okolo 4000 dětí s využitím metod AR, jsou její metody částečně společností odmítány. AR s sebou přináší řadu kontroverzí, nicméně kolem ní se šíří informační smog by neměl potlačit racionální náhled odborné i laické veřejnosti.

Metody AR, které pomáhají zvyšovat kvalitu neplodných párů, zaznamenaly od svého uvedení do humánní medicíny velký pokrok. Robert Edwards, nejvýznamnější průkopník na poli AR, obdržel v roce 2010 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

Indikace k asistované reprodukci se liší, věk neplodné ženy však zůstává nejpodstatnější determinantou úspěšnosti celého procesu. Otázkou zůstává, zda díky kontinuálnímu zkvalitňování medicínských technologií a vědeckým objevům nehrozí neadekvátní manipulace s lidskými gametami či embryi. Společnost by měla svými legislativními a kontrolními mechanismy tyto kontroverzní aspekty monitorovat a zajistit, aby se metody AR nezneužívaly pro jiné než přísné medicínské účely.

## LITERATURA

1. **Asistovaná reprodukce v České republice 2017.** ÚZIS ČR, dostupné z <https://www.uzis.cz/res/f/008274/asistreprodukce2017.pdf>. ISBN 978-80-7472-182-3.
2. **Biggers, JD.** IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25, 2, p. 118–127.
3. **Brinsden, PR.** Thirty years of IVF: the legacy of Patrick Steptoe and Robert Edwards. *Hum Fertil (Camb)*, 2009, 12, 3, p. 137–143.
4. **Bunge, RG., Keettel, WC., Sherman, JK.** Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril*, 1954, 5, 6, p. 520–529.
5. **Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., et al.** Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod*, 1990, 5, 1, p. 7–13.
6. **Craciunas, L., Tsampras, N., Raine-Fenning, N., et al.** Intrauterine administration of human chorionic gonadotropin (hCG) for subfertile women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 20, 10: CD011537. doi: 10.1002/14651858.CD011537.pub3.
7. **de La Rochebrochard, E., Quelen, C., Peikrishvili, R., et al.** Long-term outcome of parenthood project during in vitro fertilization and after discontinuation of unsuccessful in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2009, 92, 1, p. 149–156.
8. **Donfack, NJ., Alves, KA., Araújo, VR., et al.** Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zygote*, 2017, 25, 4, p. 391–403.
9. **Donnez, J., Squifflet, J., Jadoul, P., et al.** Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Fertil Steril*, 2011, 95, 5, p. 1787.e1–4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.041.
10. **Ernst, E., Bergholdt, S., Jørgensen, JS., Andersen, CY.** The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*, 2010, 25, 5, p. 1280–1281.
11. **European IVF-monitoring Consortium (EIM); European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Calhaz-Jorge, C., et al.** Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 2017, 1, 32, 10, p. 1957–1973.
12. **Garcia, JE., Jones, GS., Wright, GL. Jr.** Prediction of the time of ovulation. *Fertil Steril*, 1981, 36, 3, p. 308–315.
13. **Golan, A., Weissman, A.** Symposium: Update on prediction and management of OHSS. A modern classification of OHSS. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19, 1, p. 28–32.
14. **Gunnala, V., Reichman, DE., Meyer, L., et al.** Beyond the American Society for Reproductive Medicine transfer guidelines: how many cleavage-stage embryos are safe to transfer in women  $\geq 43$  years old? *Fertil Steril*, 2014, 102, 6, p. 1626–1632.
15. **Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, AR., et al.** Defining infertility – a systematic review of prevalence studies. *Human Reprod Update*, 2011, 17, 5, p. 575–588.
16. **Handyside, AH.** 'Designer babies' almost thirty years on. *Reproduction*, 2018, 156, 1, p. 75–79.
17. **Harper, JC., Schatten, G.** Are we ready for genome editing in human embryos for clinical purposes? *Eur J Med Genet*, 2019, 62, 8, p. 103682. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103682.
18. **Hořejší, J.** Congenital developmental defects of derivatives of müllerian ducts. *Endocr Dev*, 2012, 22, p. 251–270.
19. **Humaidan, P., Nelson, SM., Devroey, P., et al.** Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials. *Hum Reprod*, 2016, 31, 9, p. 1997–2004.
20. **Chen, C.** Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 1986, 19, 1, 8486, p. 884–886.
21. **Chmel, R., Novackova, M., Janousek, L., et al.** Revaluation and lessons learned from the first 9 cases of a Czech uterus transplantation trial: Four deceased donor and 5 living donor uterus transplantations. *Am J Transplant*, 2019, 19, 3, p. 855–864.
22. **Jones, HW. Jr.** IVF: past and future. *Reprod Biomed Online*, 2003, 6, 3, p. 375–381.
23. **Kirby, T.** Robert Edwards: Nobel Prize for father of in-vitro fertilisation. *Lancet*, 2010, 376, 9749, p. 1293. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61903-4.
24. **Lane, M., Gardner, DK.** Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007, 21, 1, p. 83–100.
25. **Lenz, S., Lauritsen, JG.** Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anesthesia: a new method of collecting oocytes for in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1982, 38, 6, p. 673–677.

26. **Loutradi, KE., Kolibianakis, EM., Venetis, CA., et al.** Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 2008, 90, 1, p. 186–193.
27. **Makrakis, E., Angeli, I., Agapitou, K., et al.** Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril*, 2006, 86, 6, p. 1596–1600.
28. **Malizia, BA., Hacker, MR., Penzias, AS.** Cumulative live-birth rates after in vitro fertilization. *N Engl J Med*, 2009, 15, 360, 3, p. 236–243.
29. **Matorras, R., Mendoza, R., Expósito, A., Rodriguez-Escudero, FJ.** Influence of the time interval between embryo catheter loading and discharging on the success of IVF. *Hum Reprod*, 2004, 19, 9, p. 2027–2030.
30. **Niederberger, C., Pellicer, A., Cohen, J., et al.** Forty years of IVF. *Fertil Steril*, 2018, 15, 110, 2, p. 185–324.
31. **Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., et al.** Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update*, 2008, 14, 6, p. 605–621.
32. **Ory, S.** The American octuplet experience: a transformative event. *Fertil Steril*, 2010, 93, 2, p. 337–338.
33. **Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, AC.** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, 4, 340, 8810, p. 17–18.
34. **Paulson, RJ.** How do we decide how many embryos are safe for transfer? *Fertil Steril*, 2014, 102, 6, p. 1565–1566. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.030.
35. **Pilka, L., Travník, P., Dvorak, M., et al.** Delivery after intrauterine embryo transfer obtained by fertilization and oocyte culture in vitro. *Ces Gynek*, 1985, 50, 7, s. 452–459.
36. **Pope, CS., Cook, EK., Army, M., et al.** Influence of embryo transfer depth on in vitro fertilization and embryo transfer outcomes. *Fertil Steril*, 2004, 81, 1, p. 51–58.
37. **Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.** Performing the embryo transfer: a guideline. *Fertil Steril*, 2017, 107, p. 882–896.
38. **Shapiro, BS., Daneshmand, ST., Garner, FC., et al.** Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril*, 2011, 96, 2, p. 344–348.
39. **Shufaro, Y., Schenker, JG.** Cryopreservation of human genetic material. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1205, p. 220–224. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05651.x.
40. **Schochow, M., Rubeis, G., Büchner-Mögling, G., et al.** Social freezing in medical practice. Experiences and attitudes of gynecologists in Germany. *Sci Eng Ethics*, 2018, 24, 5, p. 1483–1492.
41. **Singh, R., Sinclair, KD.** Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology*, 2007, 1, 68, p. S56–62.
42. **Sutcliffe, AG., Ludwig, M.** Outcome of assisted reproduction. *Lancet*, 2007, 28, 370, 9584, p. 351–359.
43. **Šťastná, A., Kocourková, J., Šídlo, L.** Reprodukční stárnutí v Česku v kontextu Evropy. *Cas Lek Ces*, 2019, 158, 3–4, s. 126–132.
44. **Tesarík, J., Pilka, L., Dvorak, M., Travník, P.** Oocyte recovery, in vitro insemination, and transfer into the oviduct after its microsurgical repair at a single laparotomy. *Fertil Steril*, 1983, 39, 4, p. 472–475.
45. **Trounson, AO., Leeton, JF., Wood, C., et al.** Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science*, 1981, 8, 212, 4495, p. 681–682.
46. **Vajta, G., Rienzi, L., Cobo, A., et al.** Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online*, 2010, 20, 4, p. 453–469.
47. **van Rooij, IA., Bancsi, LF., Broekmans, FJ., et al.** Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2003, 79, 3, p. 482–488.
48. **Walsh, DJ., Walsh, AP.** Setting the stage for novel public policy and fiscal impact studies regarding the economics of in vitro fertilisation: An introduction. *J Exp Clin Assist Reprod*, 2010, 15, 7, p. 1.
49. **Zbořilová, B., Oborná, I., Tkadlec, E., et al.** Ovlivňuje použití transferového média EmbryoGlue úspěšnost embryotransferu? *Čes Gynek*, 2018, 83, 3, s. 177–181.
50. **Zhao, Y., Brezina, P., Hsu, CC., et al.** In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810, 9, p. 843–852.

**MUDr. Roman Chmel jr.**  
 Gynekologicko-porodnická klinika  
 2. LF UK a FN Motol  
 V Úvalu 84  
 150 06 Praha 5  
 e-mail: roman.chmel2@fnmotol.cz