

# Co by měl vědět ne-embryolog o laboratorních technikách asistované reprodukce a proč?

Ing.Radomír Křen, Ph.D.  
Vedoucí laboratoří IVF



člen skupiny  
FutureLife

# Úvod

- Komu je prezentace určena

- Lékaři – imunologové, gynekologové, genetici ....
- OVŠP – pracovníci laboratoří – genetika, imunolog
- Koordinátoři léčby
- Sestry

- A proč ?

- Zlepšit povědomí o možnostech léčby AR pomocí laboratorních technik IVF
- Individuální přístup
- Spokojenost klienta



# Historie laboratorních technik AR v ČR

- **4. 11. 1982** Porod prvního dítěte ze zkumavky v České republice a bývalé východní Evropě (světová priorita metody GIFT)
- **29. 10. 1984** Porod prvního dítěte po metodě IVF v České republice
- 1991 První zamržené vzorky spermií
- 1992 Zahájen program kryokonzervace embryí
- **1994** Zavedení prodloužené kultivace embryí. Začátek standardního provádění mikromanipulačních technik (AH)
- **1995** Zavedení techniky intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI) a porod prvního dítěte po této metodě oplozování v České republice
- 1997 Zahájení program darčovství oocytů a embryí. Zavedení metod získání spermií z nadvarle (MESA) a varle (TESE) [7]
- **2001** Klinické provádění preimplantační genetické diagnostiky (PGD) a dosažení prvního těhotenství po PGD
- 2005 Kryokonzervace ovarialní tkáně u žen před onkologickou léčbou
- **2007** Zavedení metody rychlého mražení – vitrifikace
- 2008 Provádění nativních cyklů, kdy jsou oocyty získány bez hormonální stimulace nebo s minimální stimulací vaječníků
- 2010 Zavedení metody selekce spermií před oplozováním metodou ICSI, tzv. PICSI
- **2011**-Zavedení semikontinuálního monitoringu embryí - timelapse
- **2016** MACS
- **2018** MFSS
- **2020** Zona free embryo transfer

# Laboratorní metody AR podle typu

- Mikromanipulační
  - ICSI
  - AZH
  - Biopsie
  - Zona free
- Selekční
  - PICSI
  - MACS
  - MFSS
- Kultivační
  - Vertikální
  - Horizontální
  - Semikontinuální monitoring
- Media
  - Embryogluce
  - Embryogen
- Kryokonzervační
  - Slow freezing
  - Vitřifikace



# Mikromanipulační techniky

## ICSI – intracytoplasmic sperm injection

- Poprvé použita v roce 1992 v Belgii týmem Dr. Palermo
- Alternativa k IVF při špatné kvalitě spermií
- Do současné doby neprodělala významných změn
- Fertilizace po ICSI jako jeden z KPI pro IVF laboratorů (ESHRE 2017)



Performance indicators for the ART laboratory

11

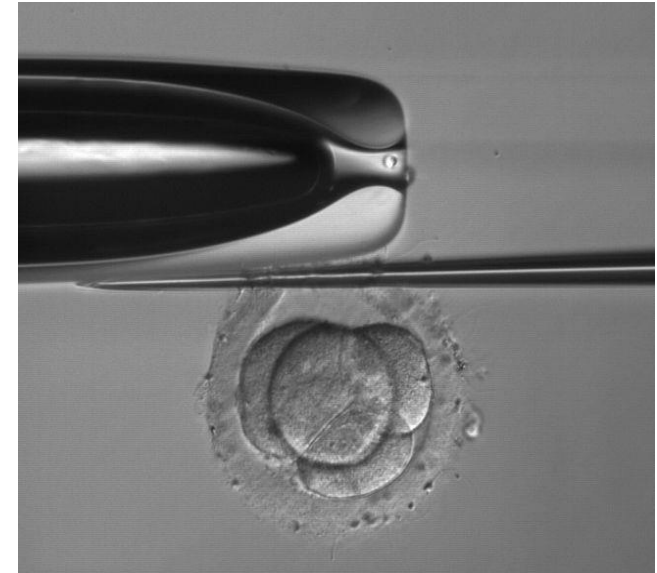
**Table IV** KPIs for the ART laboratory.

KPI	Calculation	Competency value (%)	Benchmark value (%)
ICSI damage rate	$\frac{\text{no. damaged or degenerated}}{\text{all oocytes injected}} \times 100$	$\leq 10$	$\leq 5$
ICSI normal fertilization rate	$\frac{\text{no. oocytes with 2PN and 2PB}}{\text{no. MII oocytes injected}} \times 100$	$\geq 65$	$\geq 80$
IVF normal fertilization rate	$\frac{\text{no. oocytes with 2PN and 2PB}}{\text{no. COCs inseminated}} \times 100$	$\geq 60$	$\geq 75$

# Mikromanipulační techniky

## AZH – assisted hatching

- Umělé narušení obalu embryí zona pellucida
- Poprvé popsána v roce 1989 v Atlantě týmem Dr. Cohena a Maltera
- Tři typy provedení
  - Chemicky – Tyrodův roztok
  - Mechanicky – skleněnou mikrojehlou
  - Laser
- V současnosti používán zejména po kryokonzervaci a při biopsiích
- Nebyl s určitostí prokázán vliv na úspěšnost léčby AR



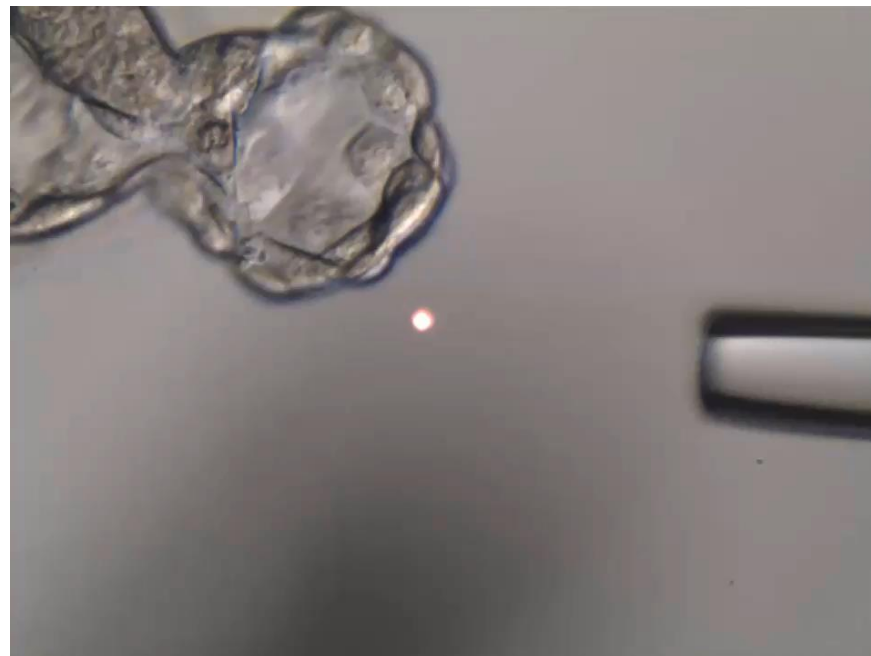
# Mikromanipulační techniky

## Biopsie embryí - odběr blastomer/ buněk trofoektodermu

- Zavedena s PGT (2001)
- První biopsie na 3 denních embryí pro účely FISH
- S rozvojem PGT (WGA, aCGH) biopsie trofoektodermu na 5. denních embryí (2010)
- Dva typy provedení
  - Mechanicky – skleněnou mikrojehlou
  - Laser
- Indikace
  - PGT-A – aneuploidie – početní změny chromosomů – věk nad 35, opakované aborty
  - PGT-M- mutace genů CF, SMA, HD
  - PGT-SR – chromosomální přestavby t(14,21)

# Mikromanipulační techniky

## Biopsie blastomer/trofoektodermu

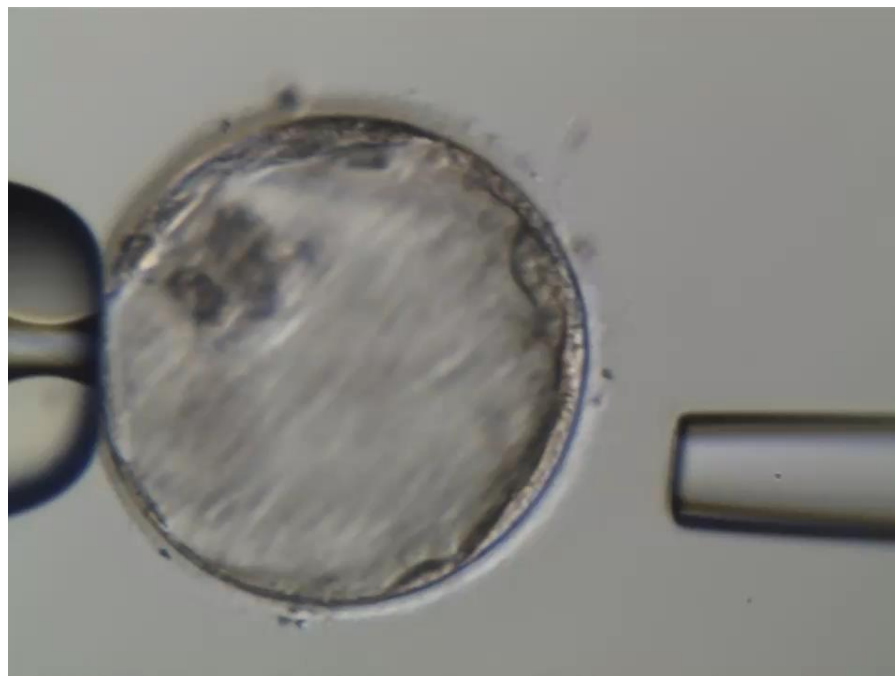




# Mikromanipulační techniky

## Zona free

- Kompletní odstranění ZP před ET
- U pacientek s přítomností protilátek proti ZP
- Kombinace technik AZH a biopsie



# Výsledky léčby

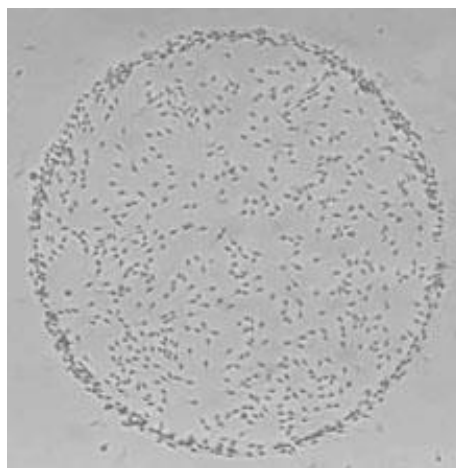
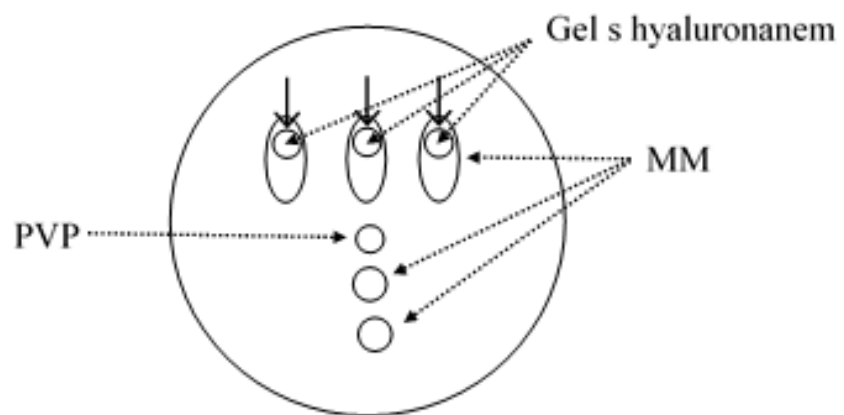
## Zona free

- Počet ET : 27
  - Počet embryí: 28
  - Počet gravidit: 16
  - Počet plodů: 16
  - Počet těhotenství do 24 týdne: 14
  - PR: 61%
  - OPR: 53.8%
  - IR: 59,3%
- 
- Ø PR za rok 2019 u všech léčebných cyklů 40,1 %
  - Ø IR za rok 2019 u všech léčebných cyklů 35,7 %

# Selekční techniky

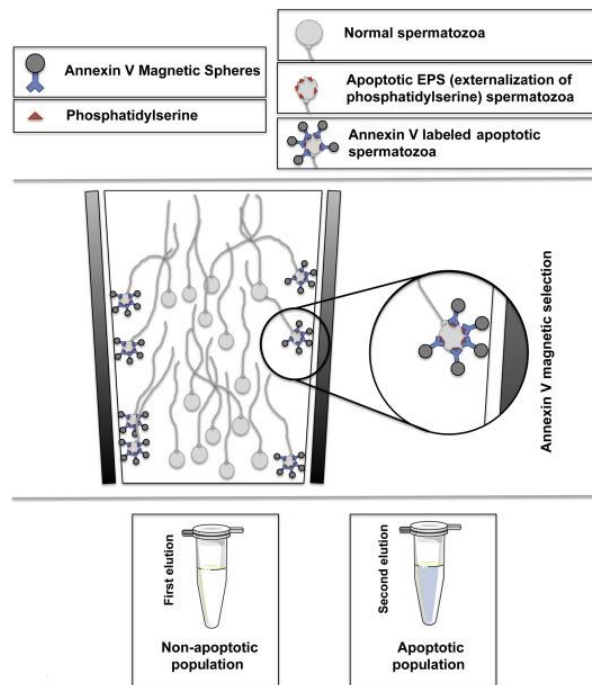
## PICSI – Preselektovaná injekce spermií

- Selektce spermií před ICSI pomocí jejich vazby na hyaluronan



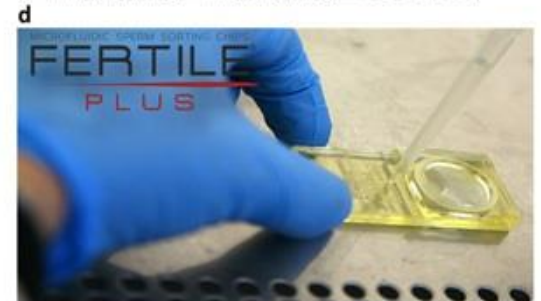
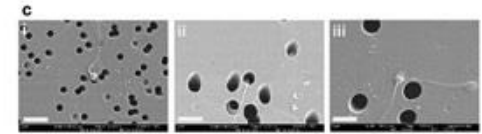
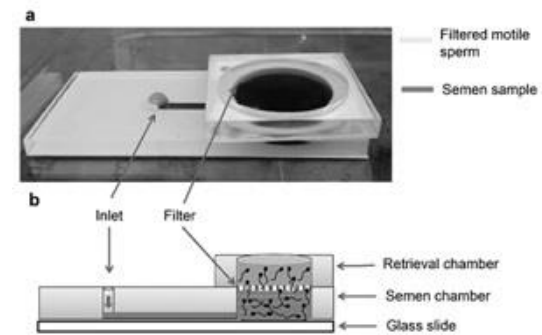
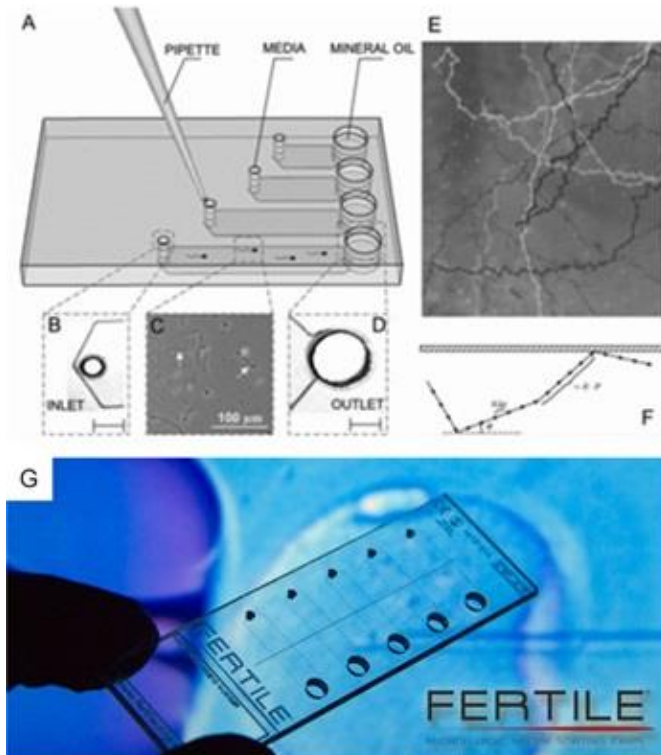
# Selekční techniky

## MACS – Magnetic activated cell sorting



# Selekční techniky

## MFSS – Microfluidic sperm sorting



# Selekční techniky

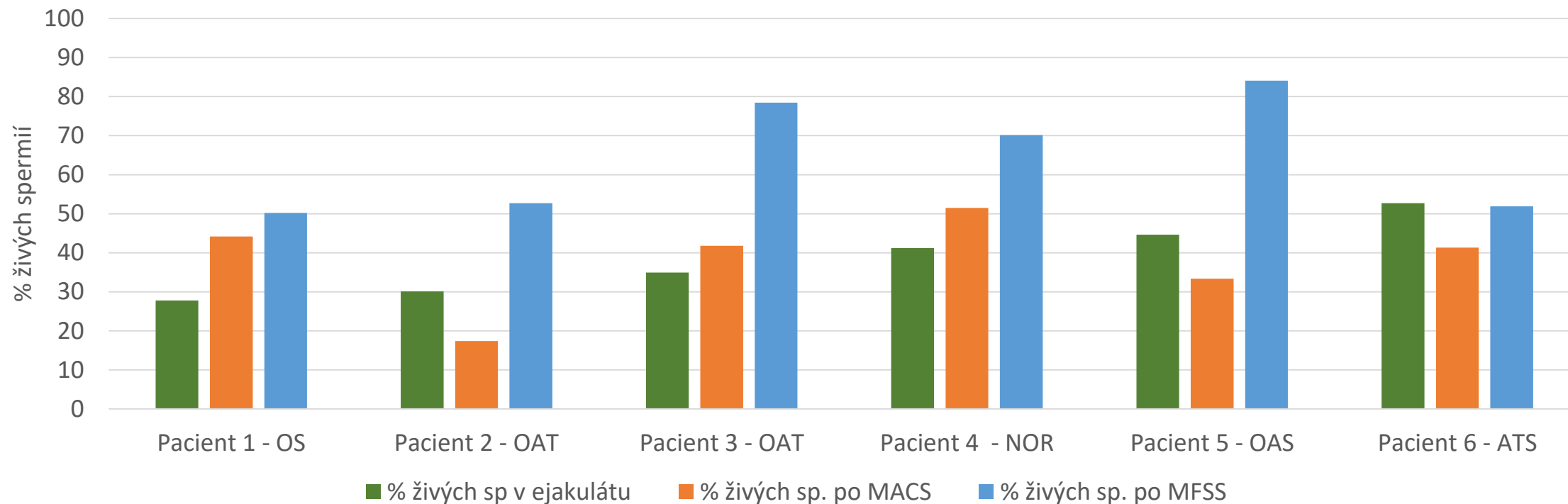
MFSS



# Výsledky léčby

## MACS x MFSS

### Separace MACS x MFSS



# Metody kultivace

- **Vertikální kultivace**

- Velké objemy 150 – 200 L
- Několik pater
- Kapacita až 48 misek
- 100 % vlhkost
- Velká spotřeba plynů
- Hromadná kultivace



- **Horizontální kultivace**

- Malé rozměry
- Komorový inkubátor 1 komora 2 až 4 misky
- Kapacita až 24 misek
- 40-70 % vlhkost podle prostředí
- Malá spotřeba plynů
- Kultivace po pacientkách





# Metody kultivace

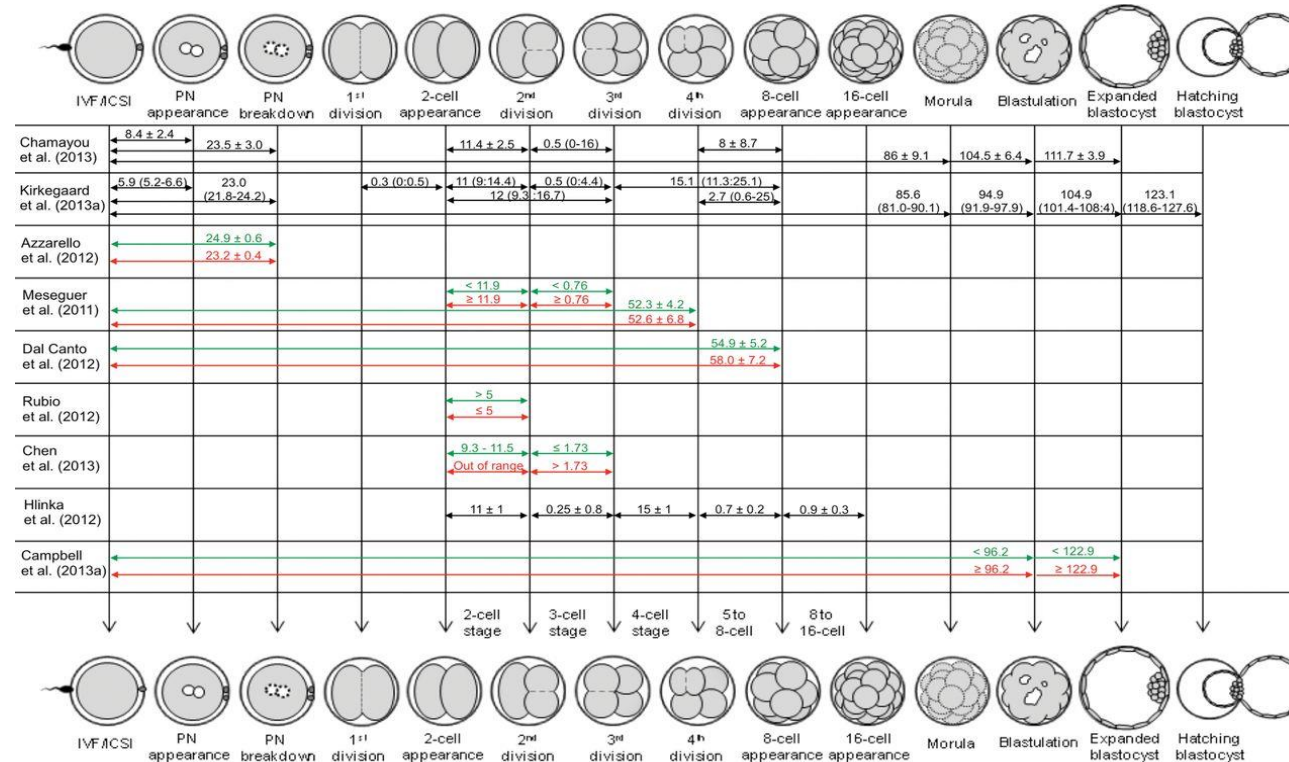
- Kultivace se semikontinuálním monitoringem

- Horizontální inkubátor s kamerou
- Individuální kultivace
- Kapacita až 15 misek po 16 embryích
- 40-70 % vlhkost
- Malá spotřeba plynů
- Sledování vývoje embrya on-line
- Vysoká cena



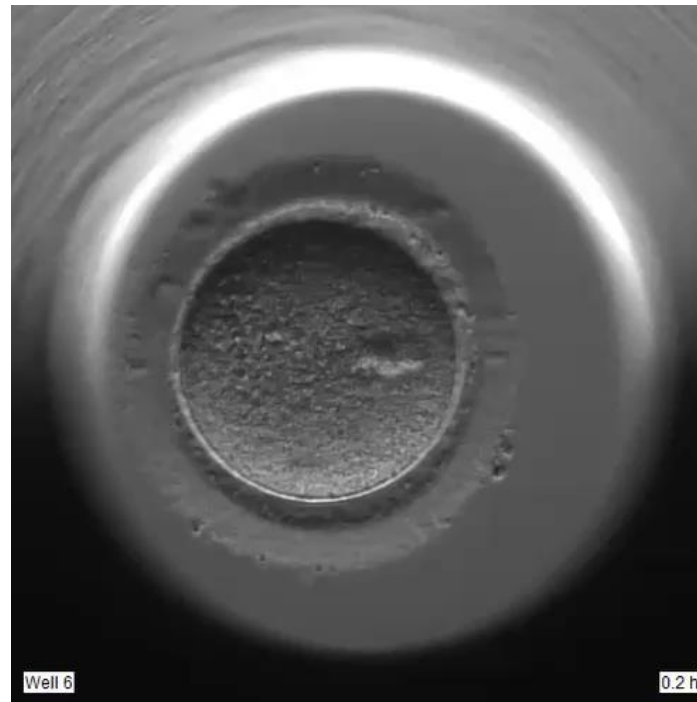
# Metody kultivace

- Kultivace se semikontinuálním monitoringem

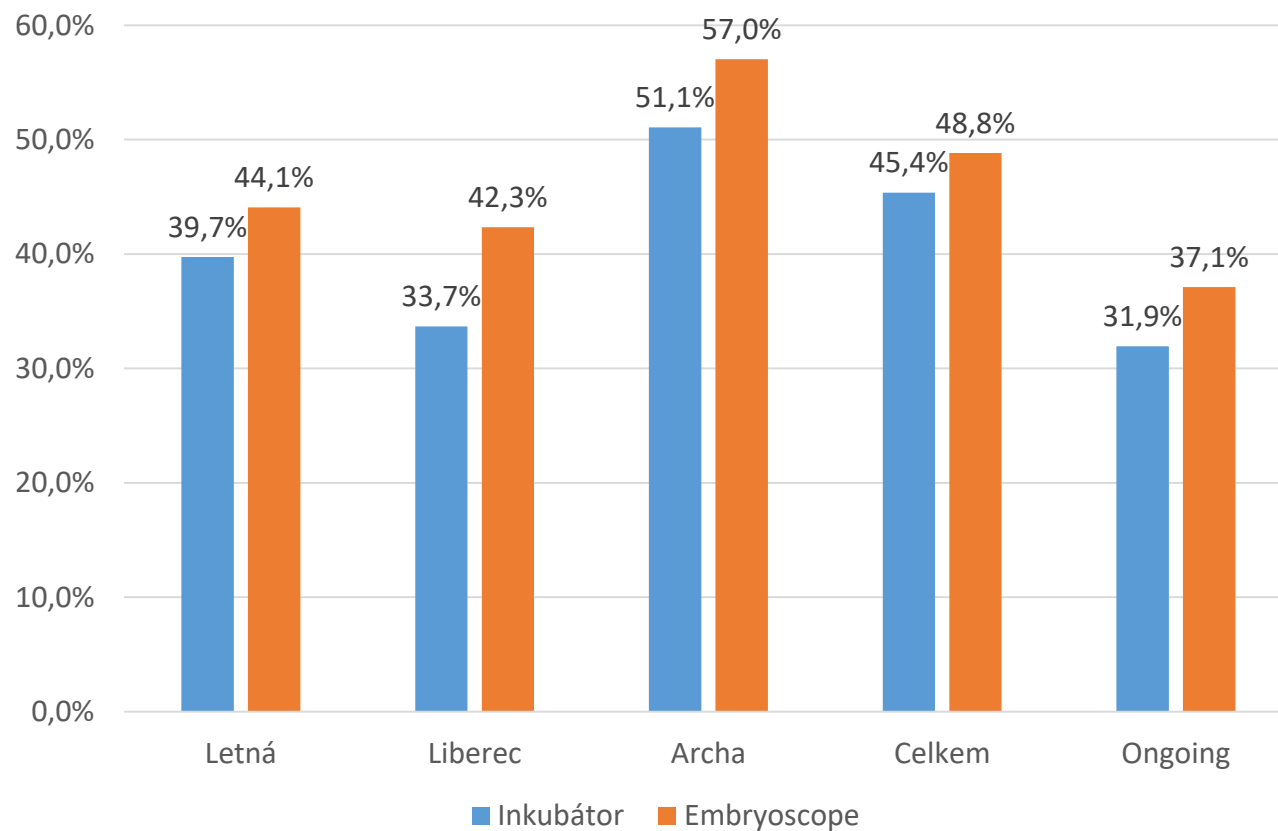


# Metody kultivace

- Kultivace se semikontinuálním monitoringem



# Výsledky léčby podle metody - Embryoscope



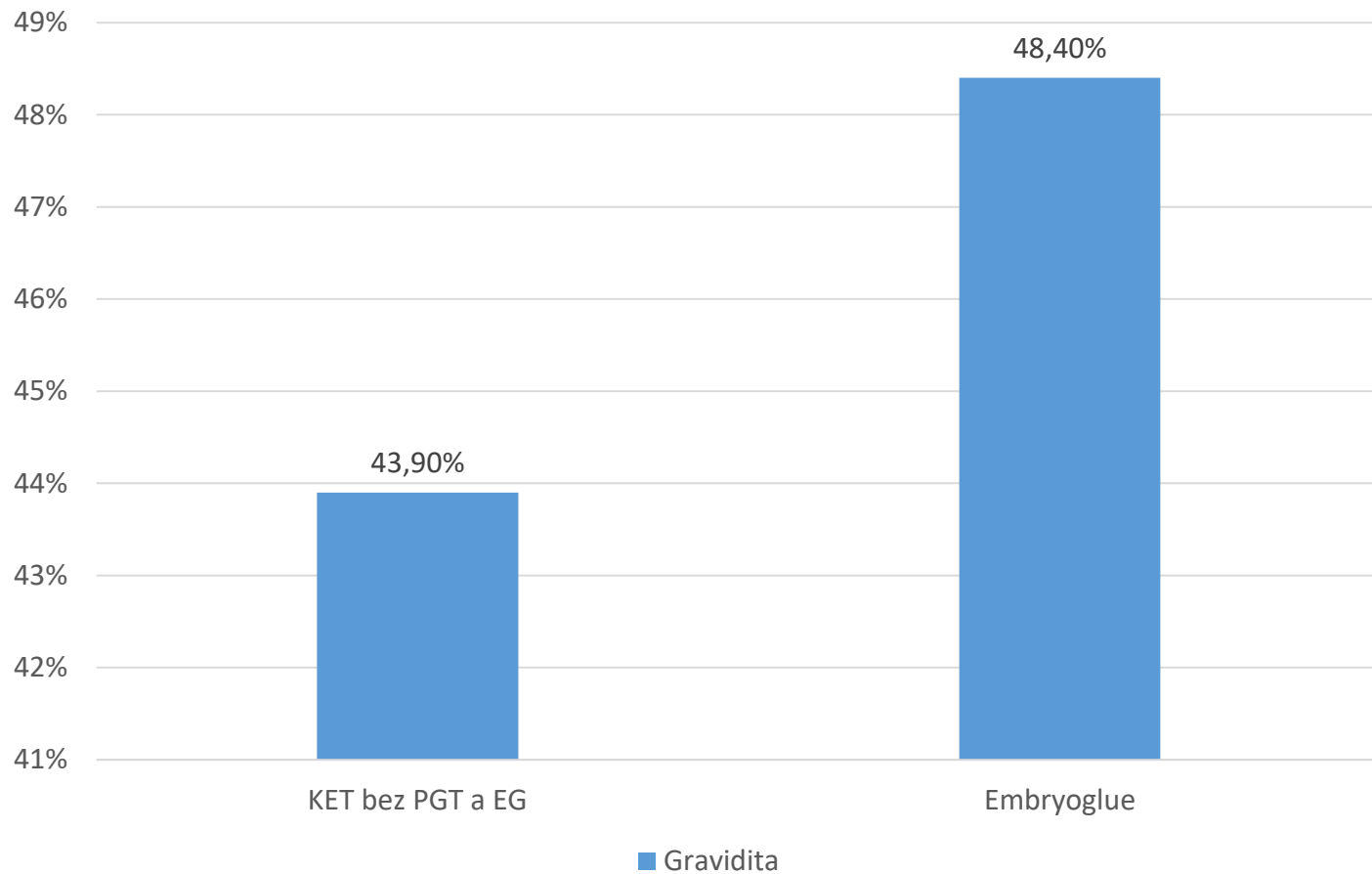
	Inkubátor	Embryoscope
Letná	3151	397
Liberec	478	600
Archa	4103	703
Celkem	7732	1700

# Media

- Embryogluce
  - Transferové médium s bikarbonátovým pufrům ( $\text{HCO}_3^-$ ) s obsahem soli kyseliny hyaluronové a HSA
  - Hyaluronan svým charakterem mukopolysacharidu (lineární glykosaminoglykan) „slizu“ zvyšuje adhezi (přichycení) embrya po opuštění ZP k sliznici děložní, což pravděpodobně umožňuje lepší reakci receptoru endometria na působky buněk trofoektodermu (L-selektin) a lepší zahníždění.

# Výsledky léčby

## podle metody – KET, Embryogluce



	PR	ET	%
KET	54	123	43,9%
Embryogluce	46	95	48,4%
Celkem	165	342	48,2%

# Kryokonzervace

- Pomalé mražení – slow freezing

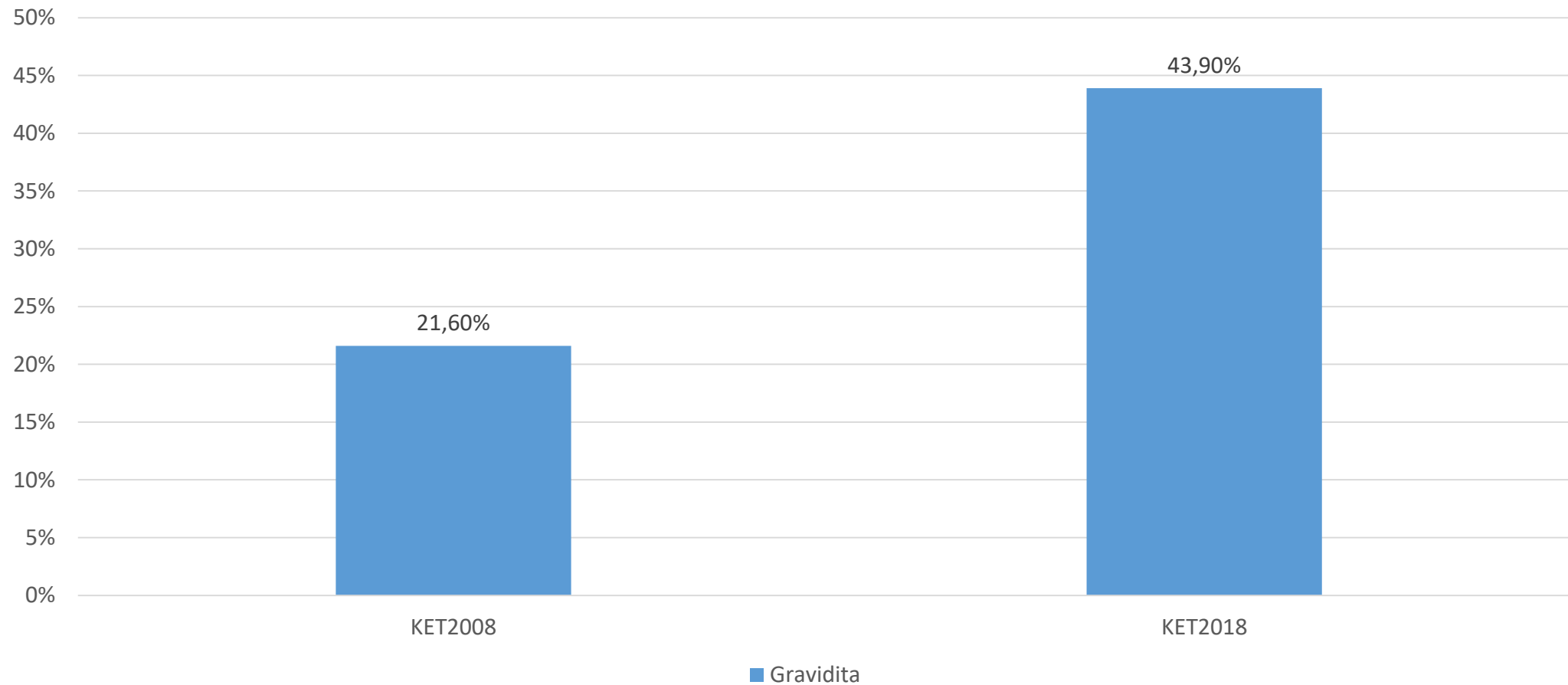
- Historicky starší způsob kryokonzervace. Spermie od roku 1953
- Pomalé ochlazování vzorku (cca 0.3 °C/min). Celkový čas mražení  $\geq 3$  hod, nízká koncentrace kryoprotektiv – 10-15%
- Pejety o objemu 200-500  $\mu\text{l}$  – možnost zamražení většího počtu embryí nebo oocytů
- Vhodné pro mražení spermií a zygot (16-18 hod po oplození)

- Vitrifikace

- Do laboratorní praxe zavedena od roku 2007
- Rychlé zmražení buněk ponořením ve vysokých koncentracích kryoprotektiv (40-60%) do  $\text{LN}_2$
- Nosiče o objemu 0,1 - 2  $\mu\text{l}$  – mražení po jednom až dvou embryích
- Vhodné pro mražení blastocyst
- Až 2 x větší přežitelnost blastocyst a 1.5x větší přežitelnost dělicích se embryí

# Výsledky léčby

## podle metody – Slow freezing, Vitrifikace





**Děkuji Vám za pozornost.**

[www.gennet.cz](http://www.gennet.cz)

[Radomir.kren@gennet.cz](mailto:Radomir.kren@gennet.cz)

 **GENNET** 

člen skupiny  
Future**Life**