NOVÉ POZNATKY O ČASNÉM VÝVOJI LIDSKÉHO ZÁRODKU, PLODNOSTI A NEPLODNOSTI

Prof. MUDr. Pavel Trávník, DrSc.

REPROMEDA Biology Park, Brno

Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha

O čem budeme hovořit

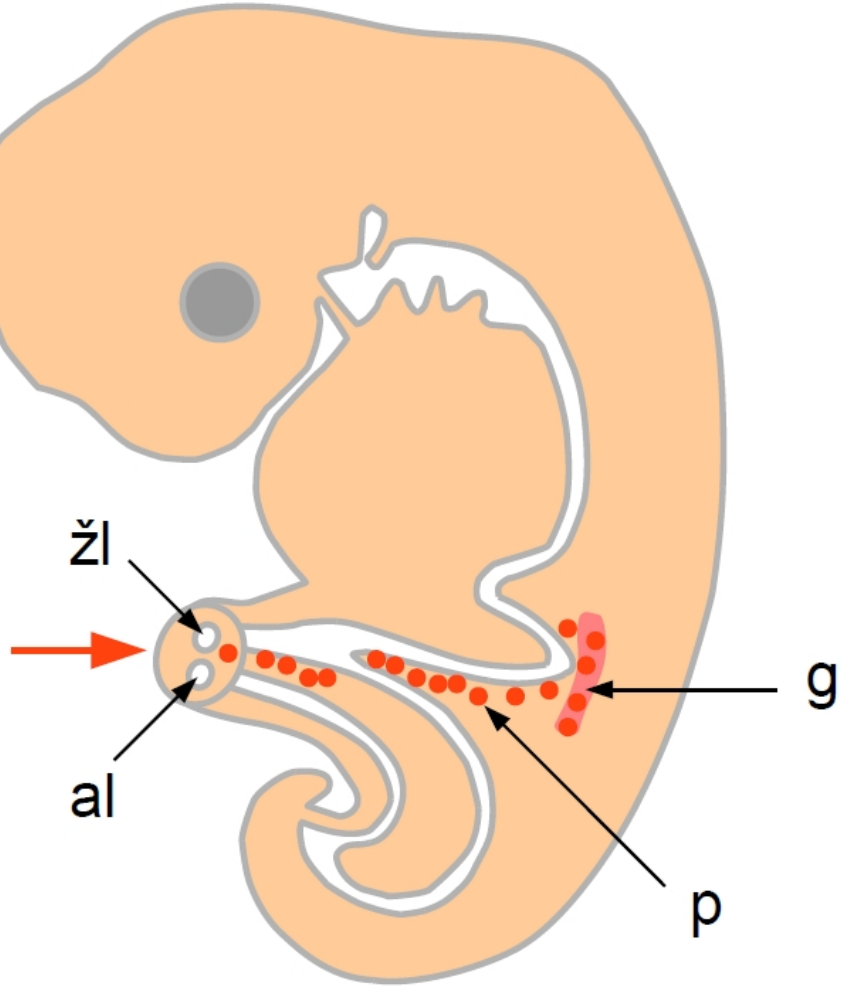
- Původ prvopohlavních buněk
- Spermie
- Oocyt
- Oplození
- Jak je nový jedinec ovlivněn ze strany matky a otce
- Časný embryonální vývoj člověka
- Jak je to s mužskou a ženskou neplodností
- Spontánní potrácení a jeho příčiny
- Nové metody asistované reprodukce a reprodukční genetiky

PŮVOD PRVOPOHLAVNÍCH BUNĚK

Odkud a kam putují

Spermie i vajíčka mají společný původ

- Prvopohlavní buňky jsou kmenové buňky spermií i vajíček
- Vznikají ve stěně žloutkového váčku a putují do základu pohlavní žlázy, který změní ke svému obrazu, podle toho, obsahují-li chromozom Y.



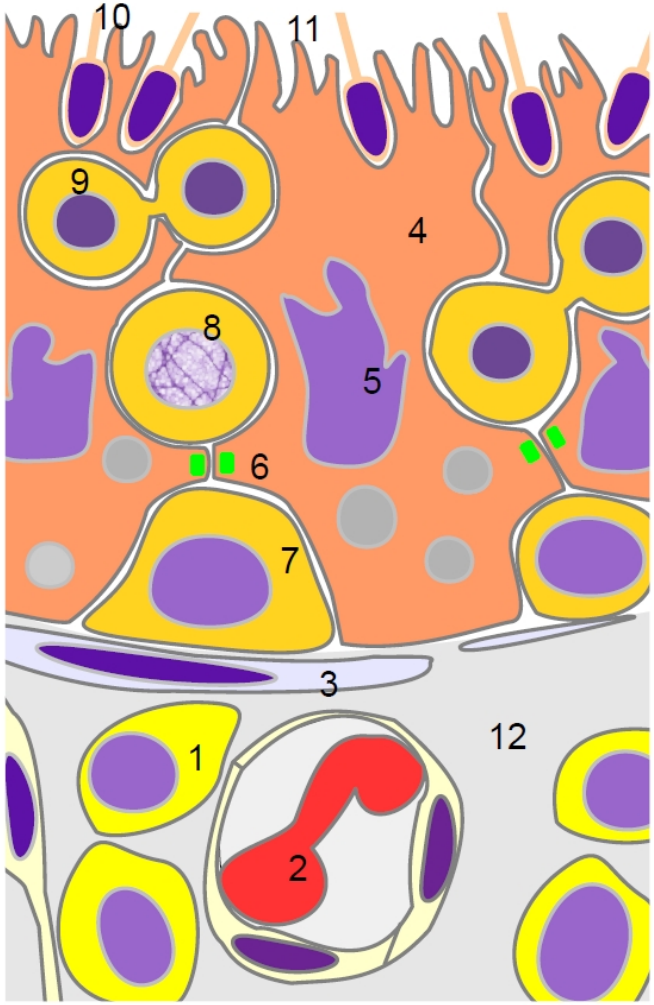
SPERMIE

Vývoj, stavba a funkce

Spermie

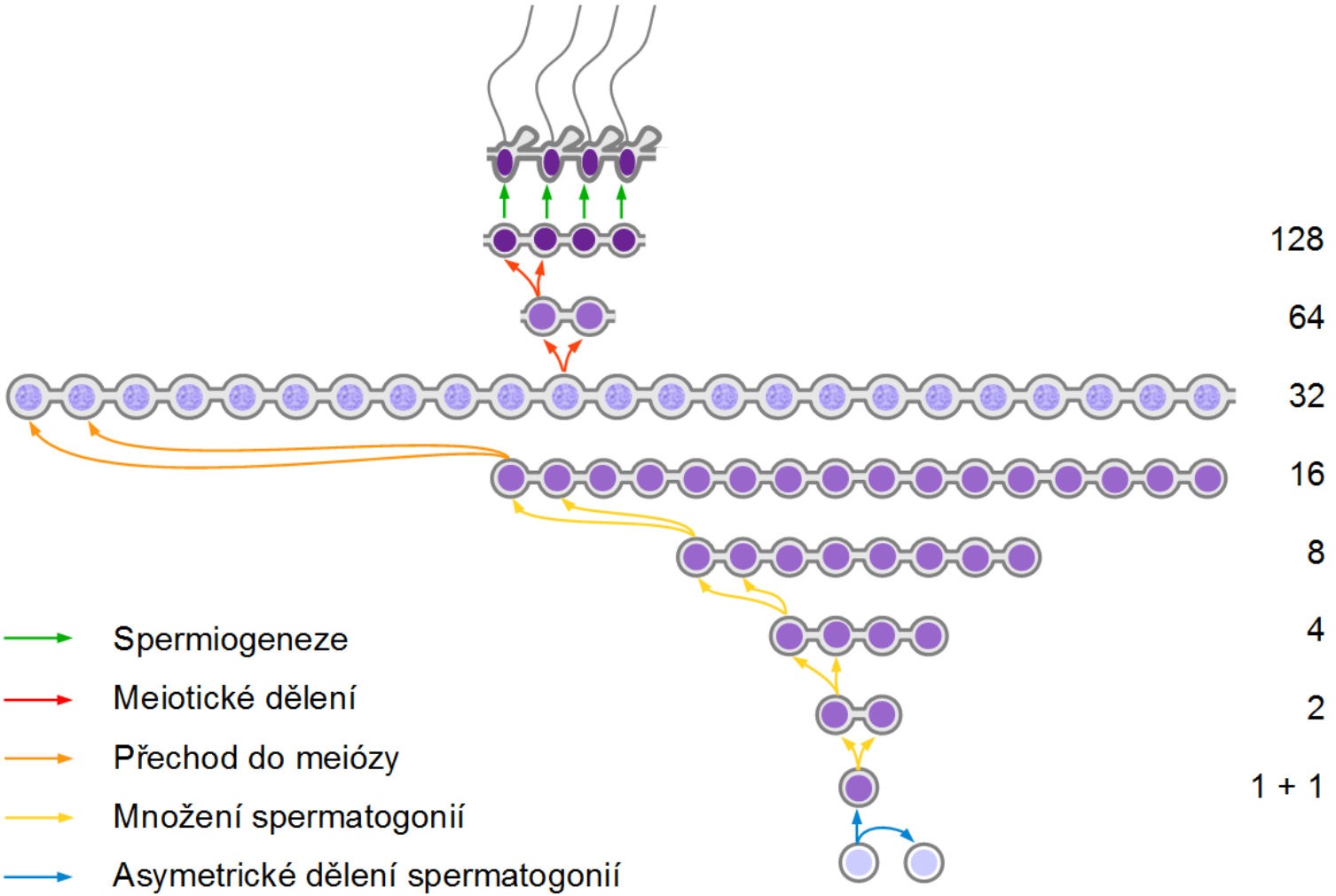
- Vzniká z haploidní spermatidy, obsahuje haploidní počet chromozomů, každý z nich je složený z 1 chromatidy
- Spermie je dlouhá cca 50μm s hlavičkou cca 5x3μm
- Živá a zdravá spermie je progresivně pohyblivá
- Má intenzivní metabolismus, zdrojem energie je glukóza
- Spermie se začnou vyvíjet až v pubertě
- Muž produkuje asi 20-30 milionů spermií za den
- Spermie má několik typů receptorů

Spermie - spermatogeneze

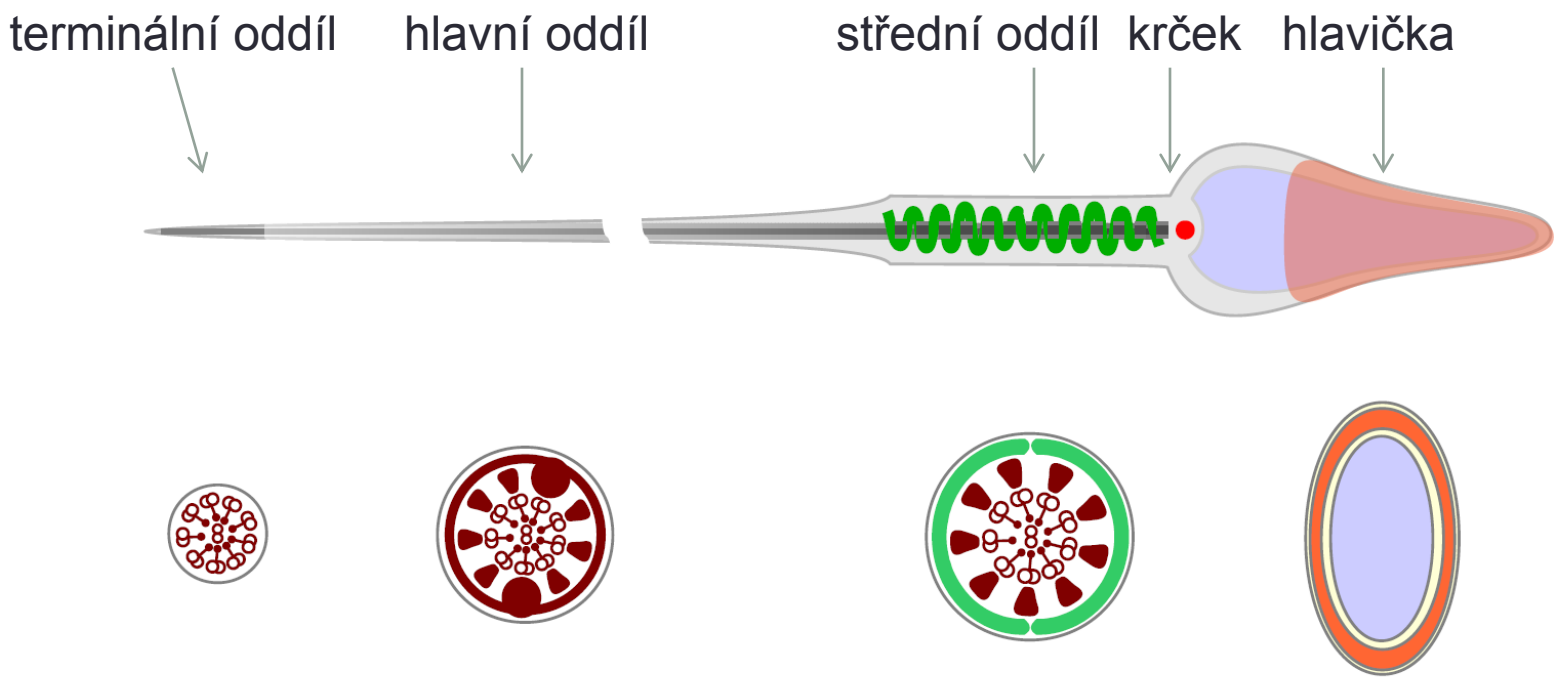


1. Leydigovy buňky
2. Erytrocyt v krevní kapiláře
3. Myoidní buňka
4. Cytoplazma Sertoliho buňky
5. Jádro Sertoliho buňky
6. Těsné spojení mezi S. buňkami
7. Spermatogonie
8. Spermatocyt I
9. Spermatida
10. Spermie zanořené do S. buněk
11. Lumen semenotvorného kanálku

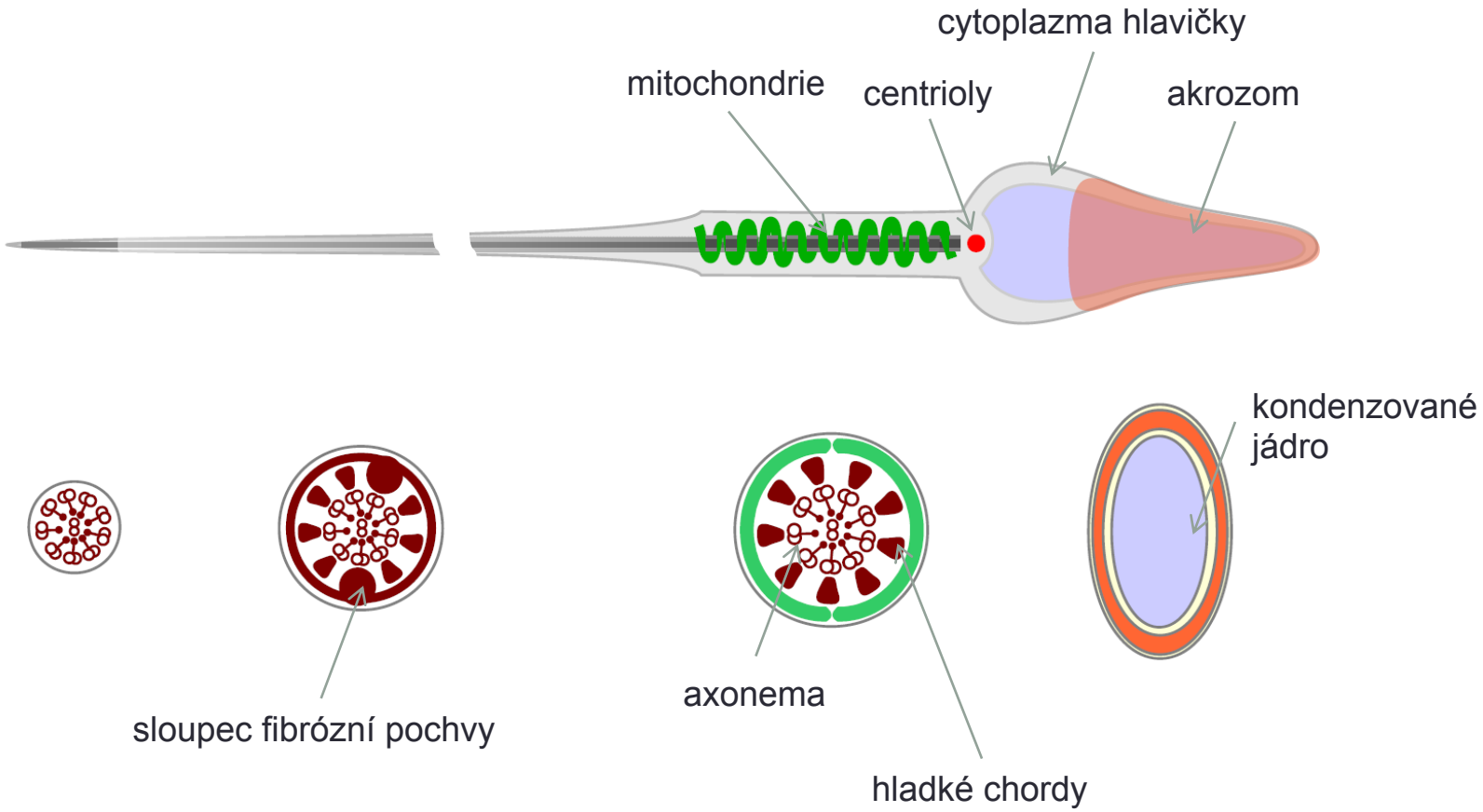
Spermie - spermatogeneze



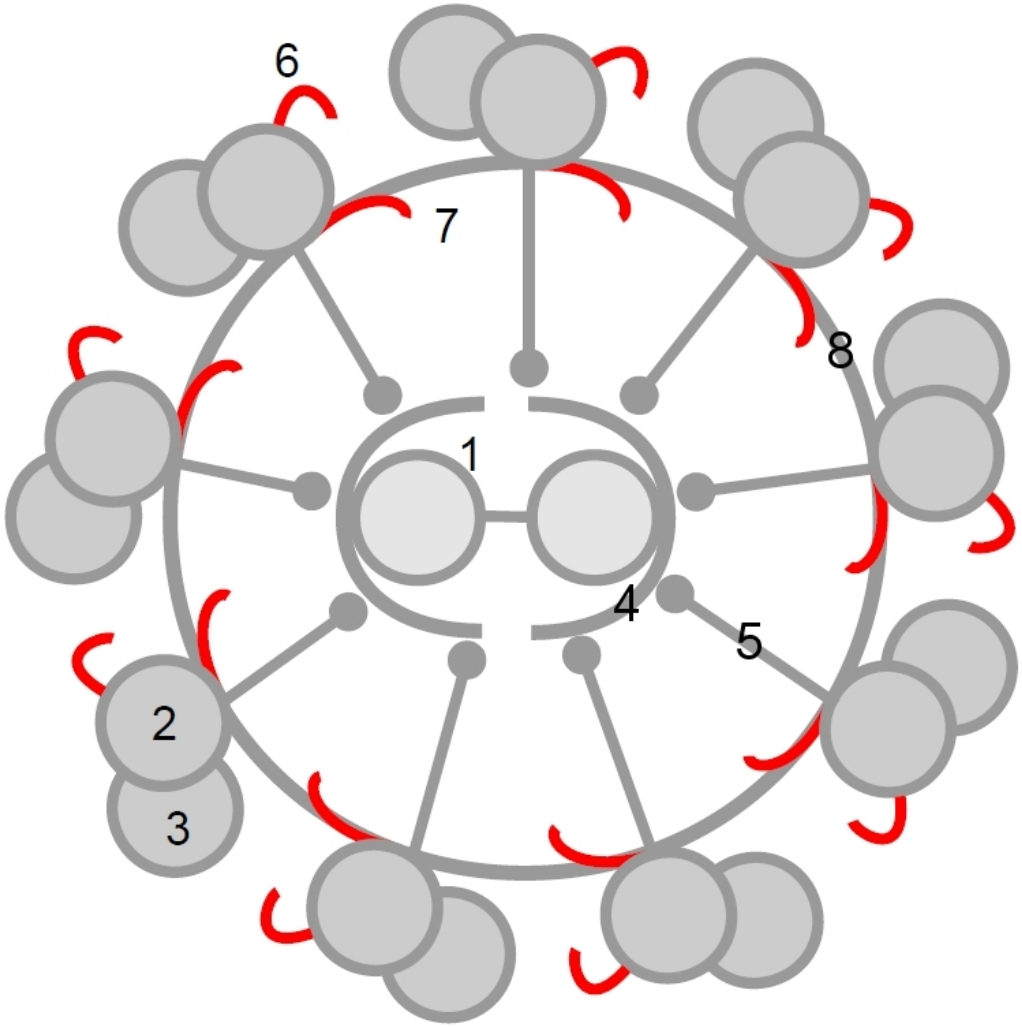
Spermie


terminální oddíl
hlavní oddíl
střední oddíl
krček
hlavička

Spermie

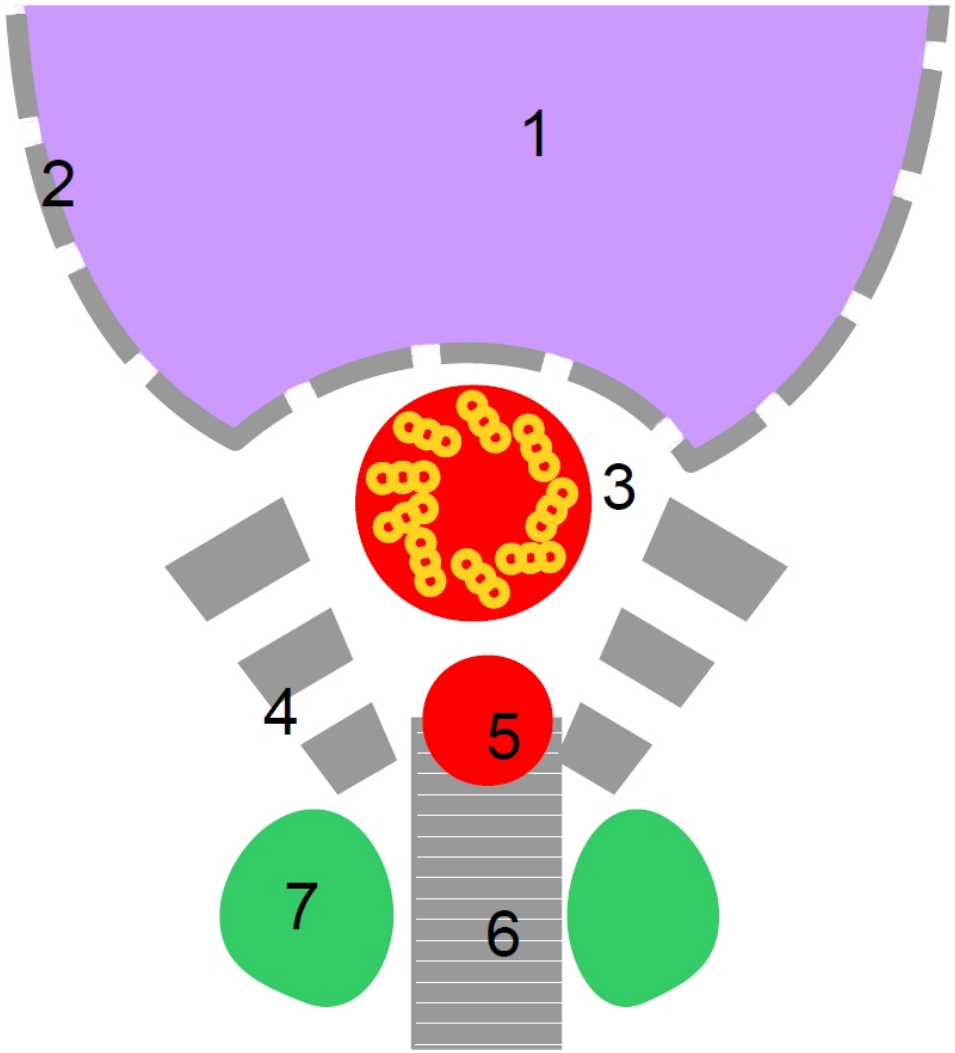

cytoplazma hlavičky
mitochondrie
centrioly
akrozom
kondenzované jádro
sloupec fibrózní pochvy
axonema
hladké chordy

Spermie - axonema



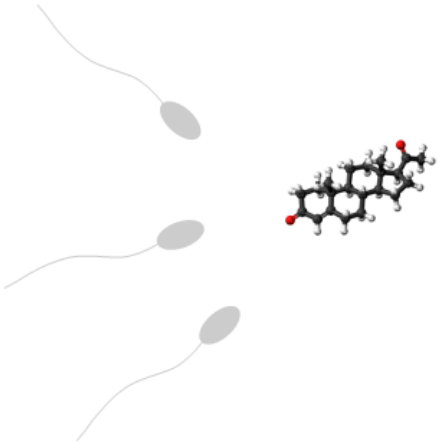
1. centrální dvojice mikrotubulů
2. periferní m. A
3. periferní m. B
4. centrální pochva
5. radiální paprsky
6. zevní dyneinové raménko
7. vnitřní dyneinové raménko
8. nexin

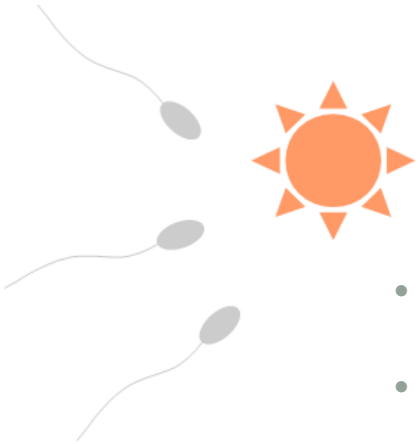
Spermie - krček



1. kondenzované jádro
2. jaderný obal s póry
3. proximální centriol
4. segmentované chordy
5. distální centriol
6. axonema
7. mitochondrie

Spermie – receptory - taxe





- Progesteronový receptor
- Mechanoreceptory
- Termoreceptory
- Chuťový receptor?

?

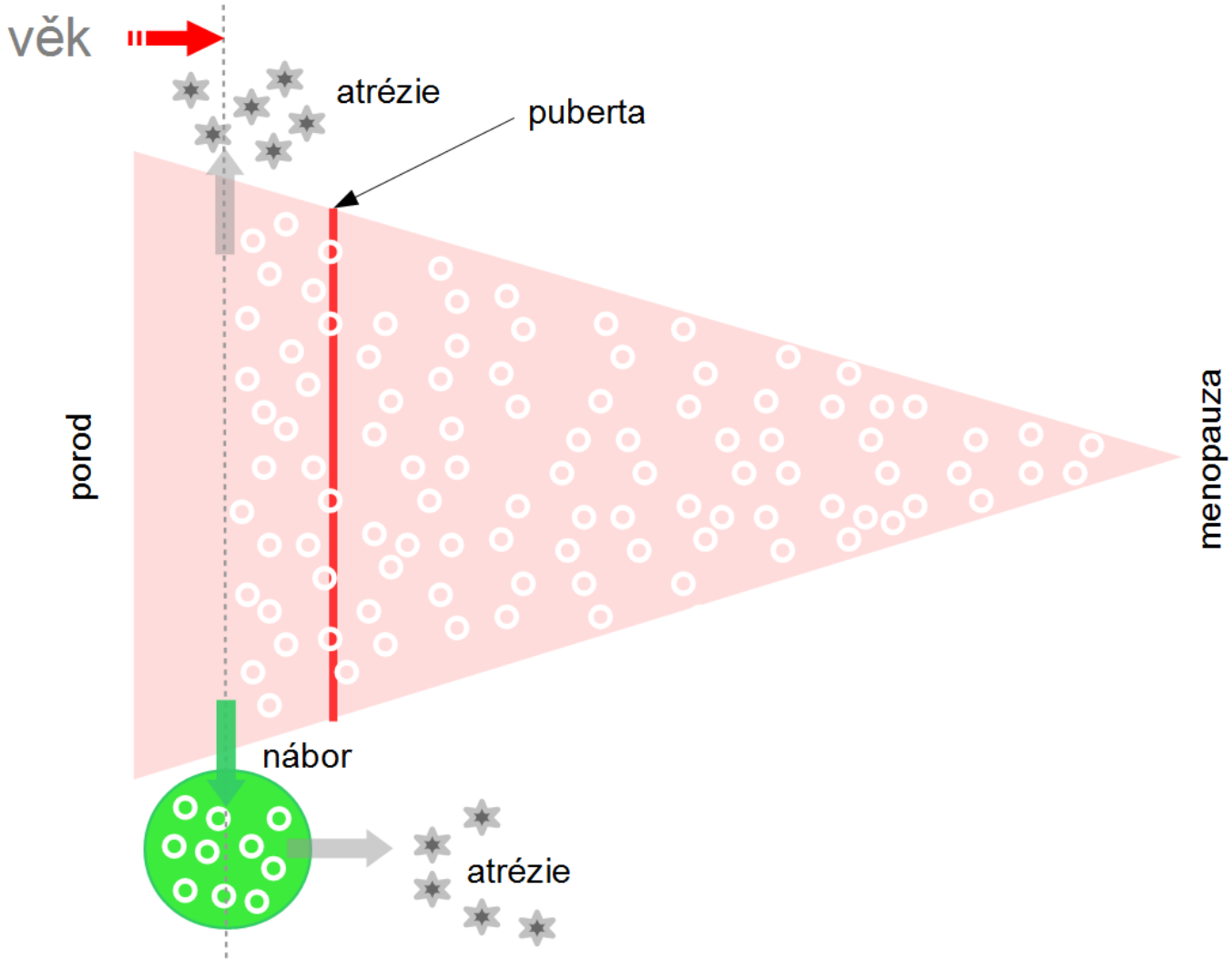
OOCYT

Vývoj, zánik, kvalita, struktura, aktivace

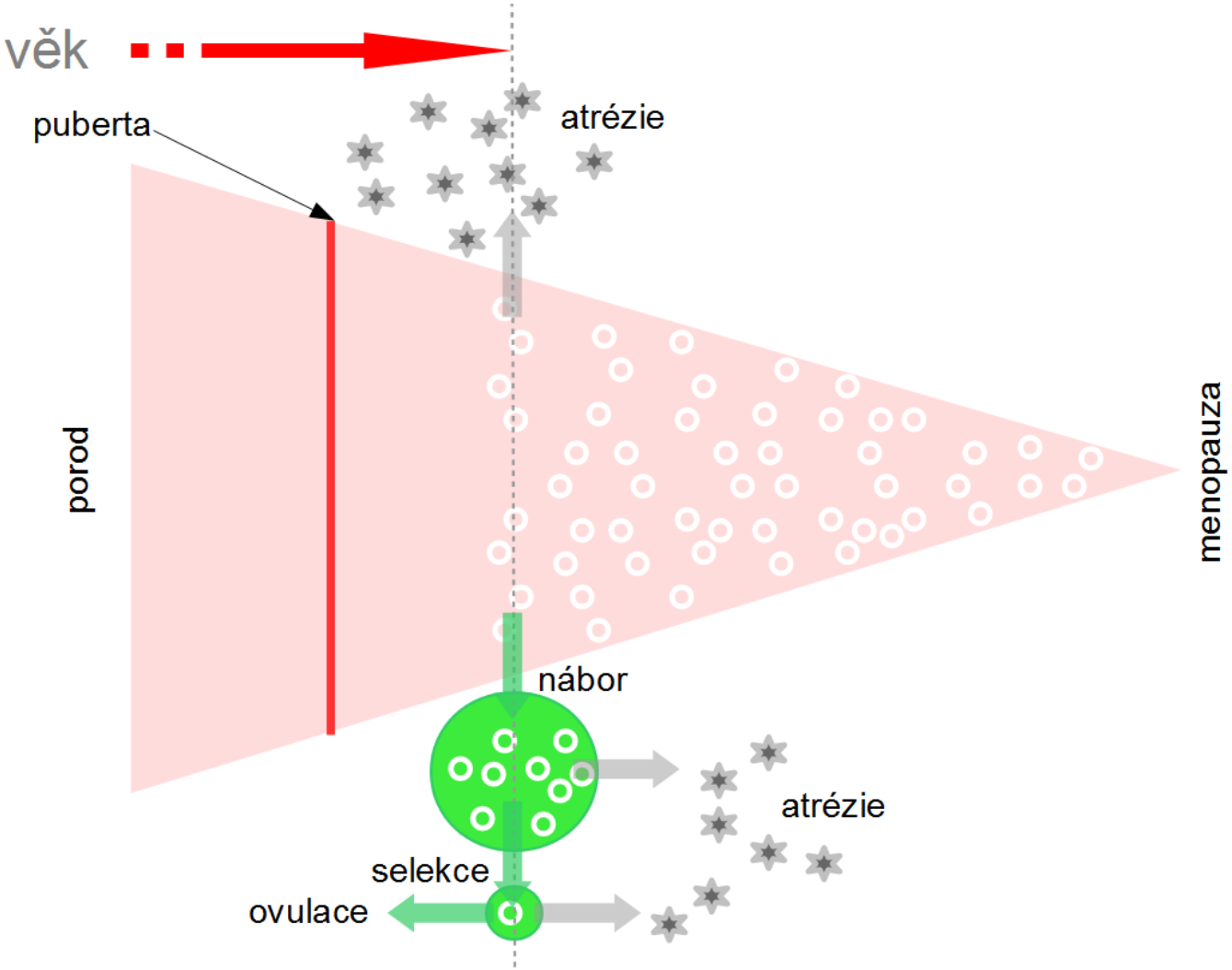
Oocyt

- Je to buňka o průměru cca 25-110μm podle stadia vývoje
- Je součástí ovariálního folikulu
- Během jeho vývoje se dokončí meióza, započatá prenatálně při vzniku primárního oocytu, před oplozením má haploidní počet chromozomů, každý složený z 1 chromatidy
- Neobsahuje centrioly
- Všechny oocyty vznikají prenatálně, při narození jich má žena cca 1 - 2 miliony, od porodu ubývají
- Oocyty, které nedospějí k ovulaci, zaniknou atrézií (její podstatou je apoptóza)

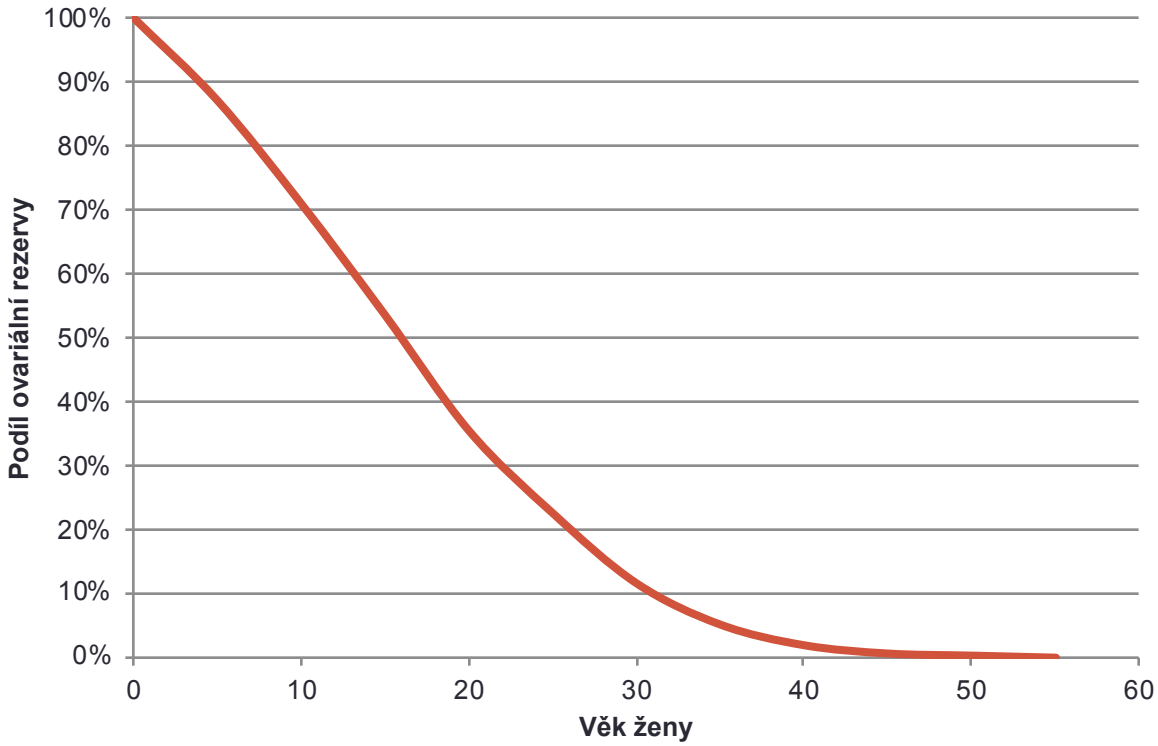
Ovariální rezerva – před pubertou



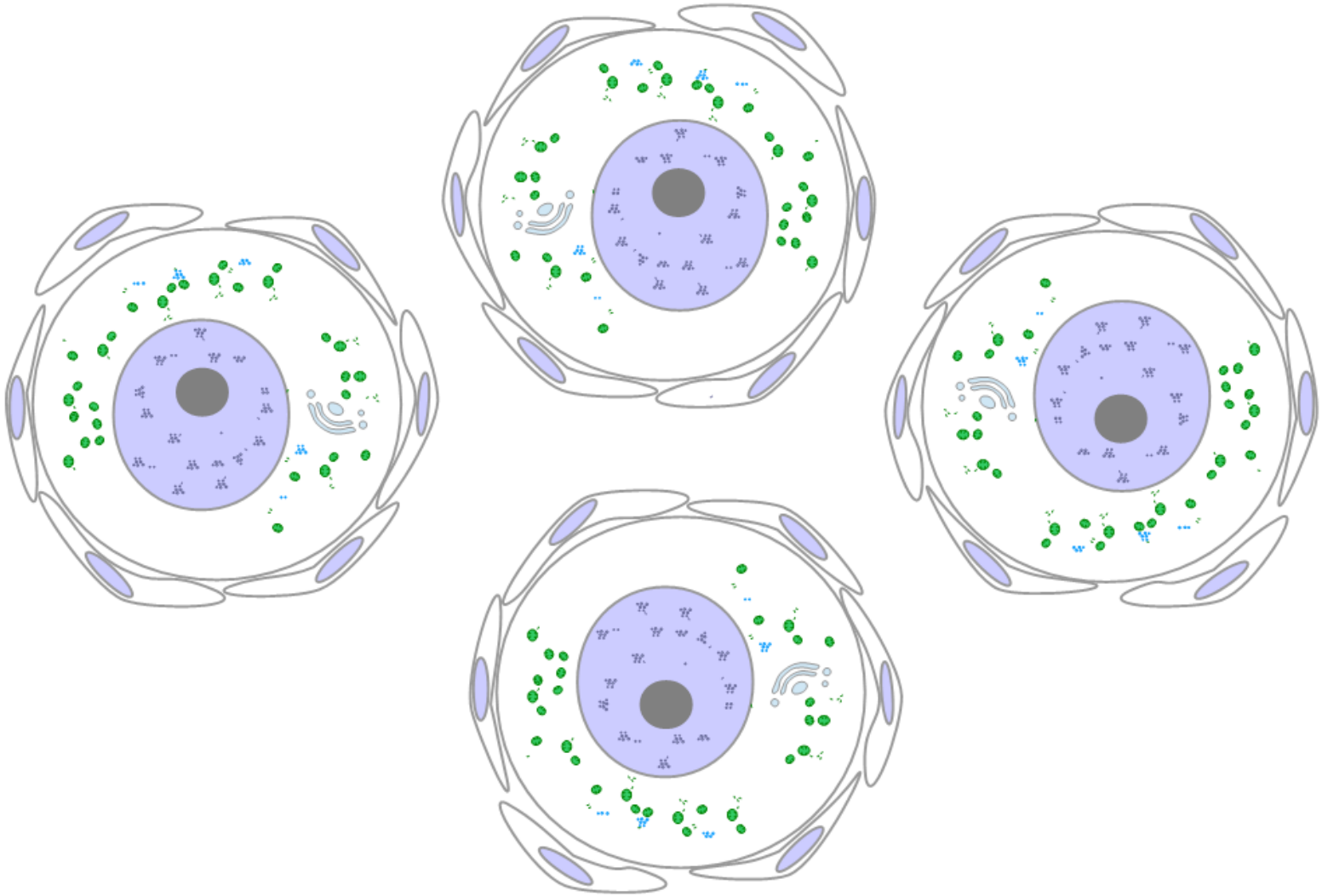
Ovariální rezerva – po pubertě



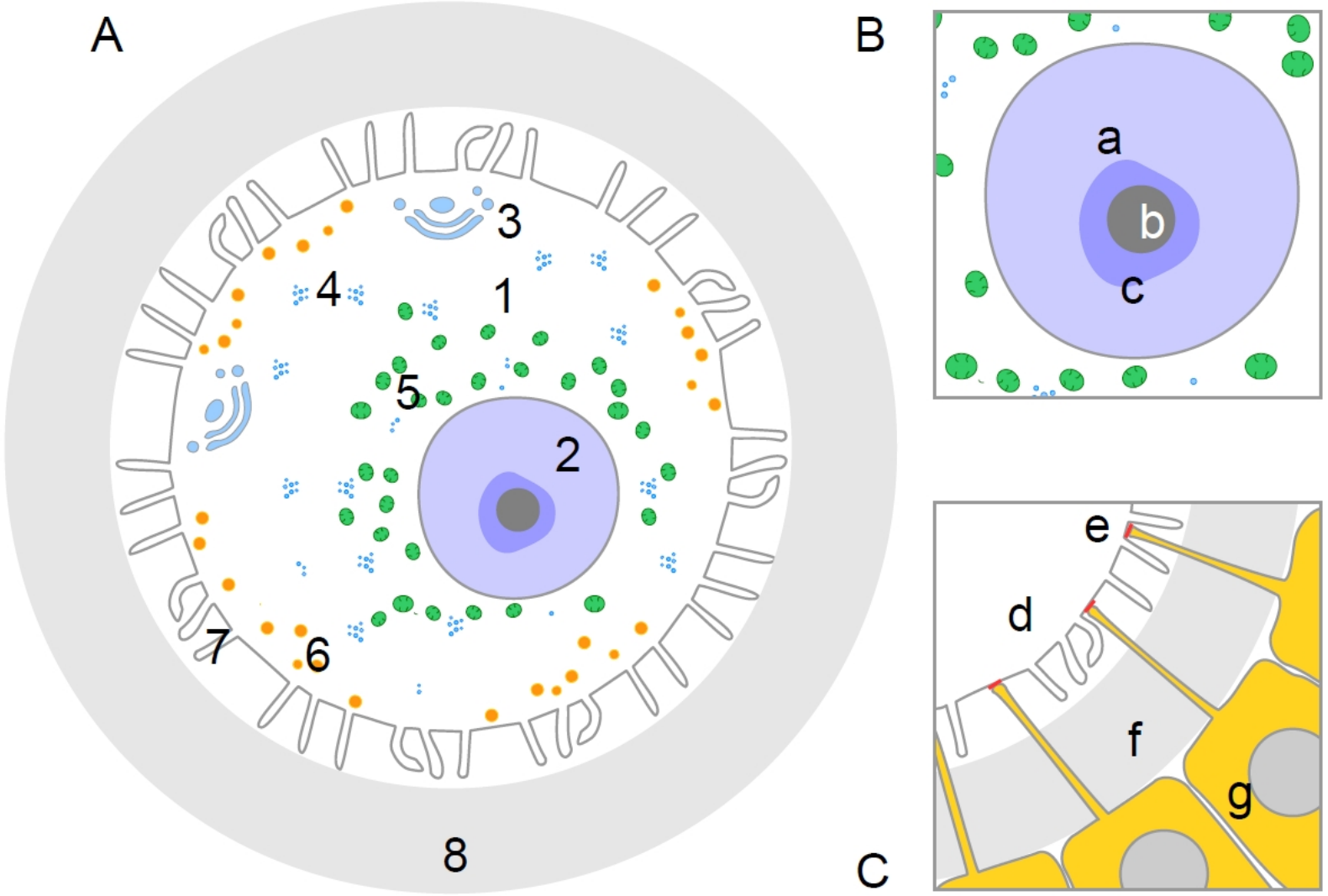
Ovariální rezerva



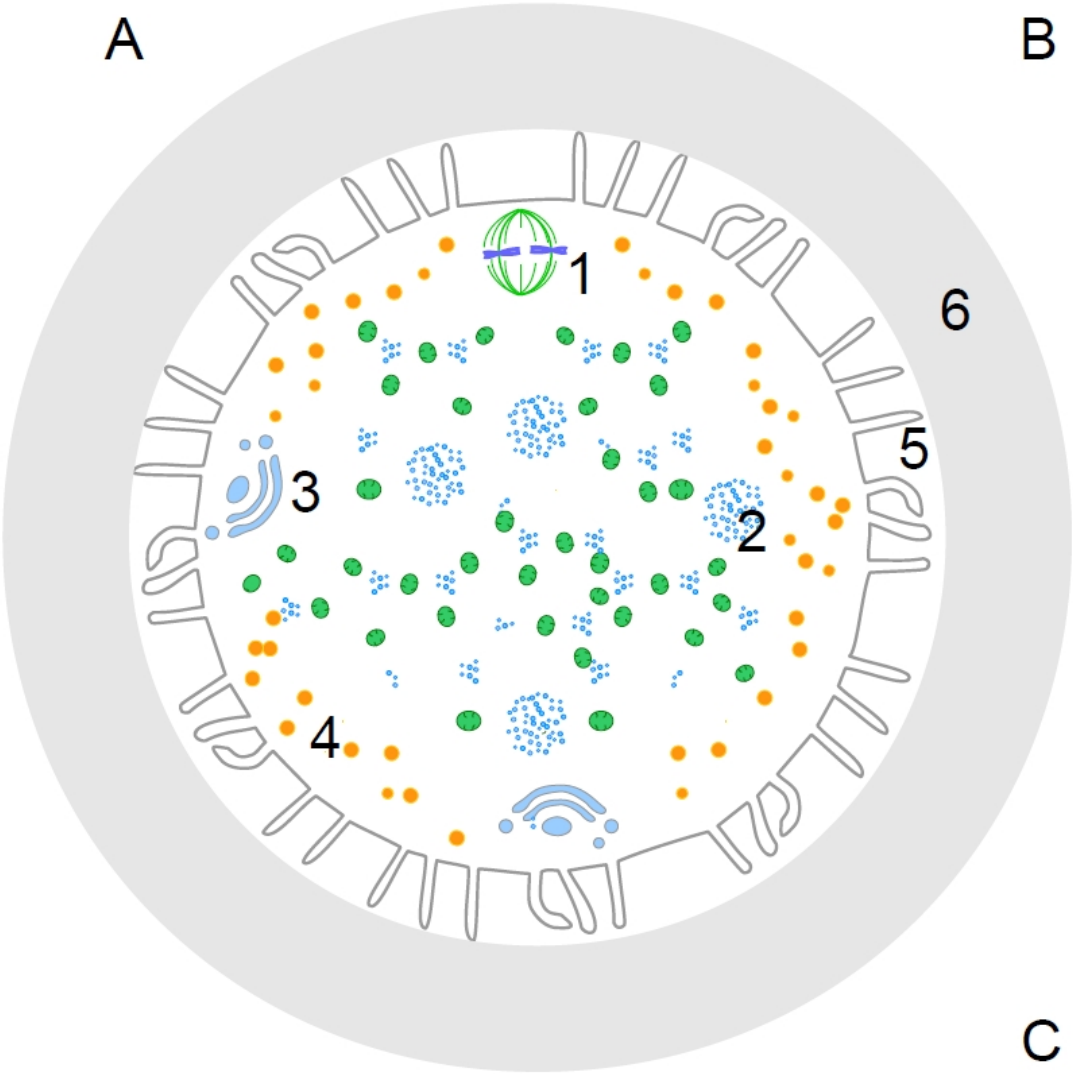
Primordiální folikul s primárním oocytem

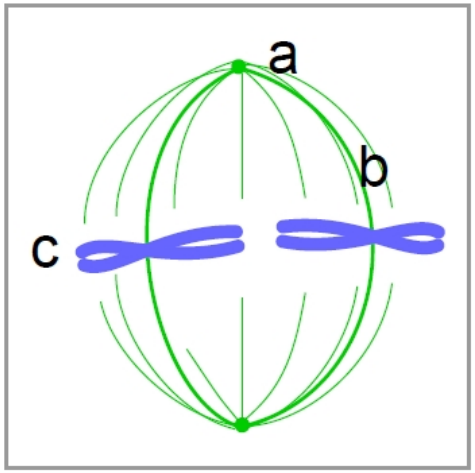


Oocyt z antrálního folikulu před RM

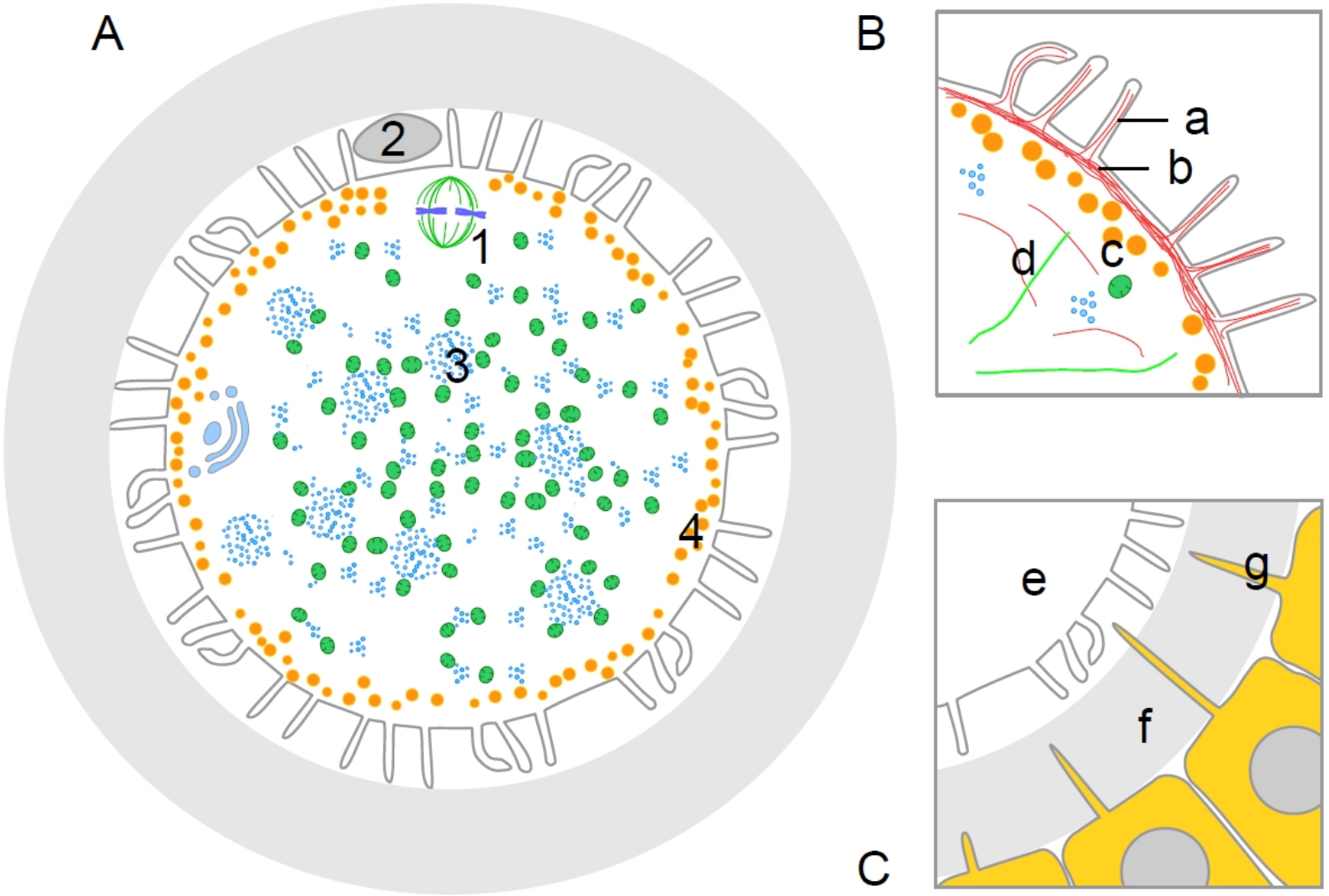


Oocyt v metafázi I





Oocyt v metafázi II



OPLOZENÍ

Kde a jak probíhá, výsledek, přínos jednotlivých gamet

Oplození – co předchází

Muž

- Spermie aktivně procházejí ze zadní klenby poševní do cervikálního hlenu
- Spermie aktivně procházejí z cervikálního hlenu do dělohy
- Spermie kolonizují ampulární části vejcovodů

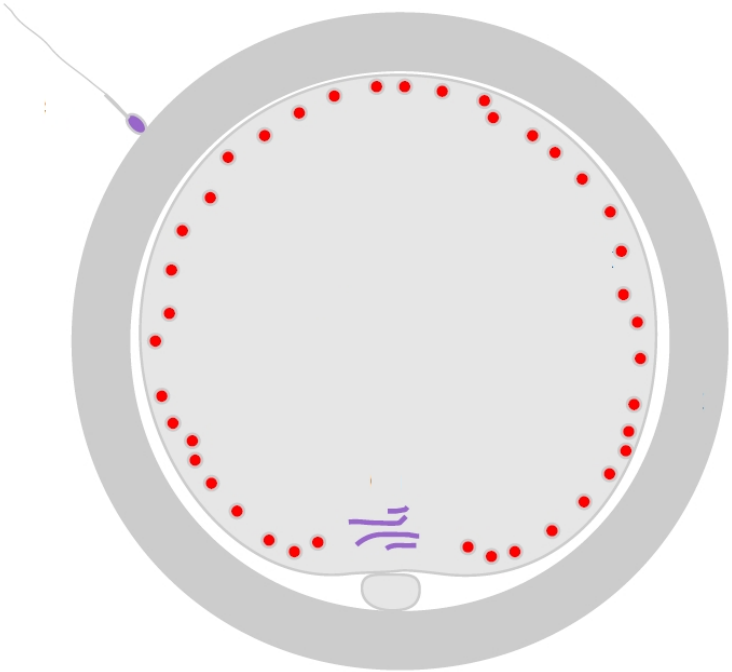
Žena

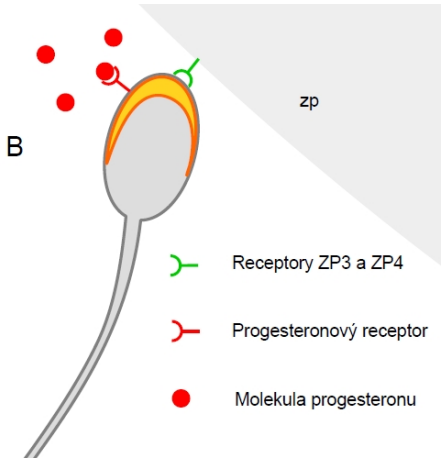
- Folikulární tekutina s kumulem obsahujícím oocyt je zachycena vejcovodem
- Kumulus s oocytem je posunován do ampulární části vejcovodu

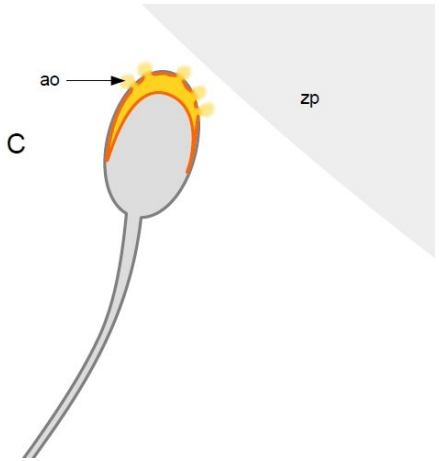
Oplození - průběh

- Spermie proniká kumulem a váže se na zonu
- Spermie proniká zonou do perivitelinního prostoru
- Spermie se váže prostřednictvím receptorů na oolemu
- Spermie je pohlcena oocytem
- Dojde ke kortikální reakci a aktivaci oocytu
- Jsou zničeny mitochondrie pocházející ze spermie
- Z hlavičky spermie a chromozomů oocytu vznikne mužské a ženské prvojádro
- Rozdělí se centriol pocházející ze spermie a vytvoří se centrosomy zygoty
- Zanikne jaderný obal prvojader a proběhne první dělení zygoty

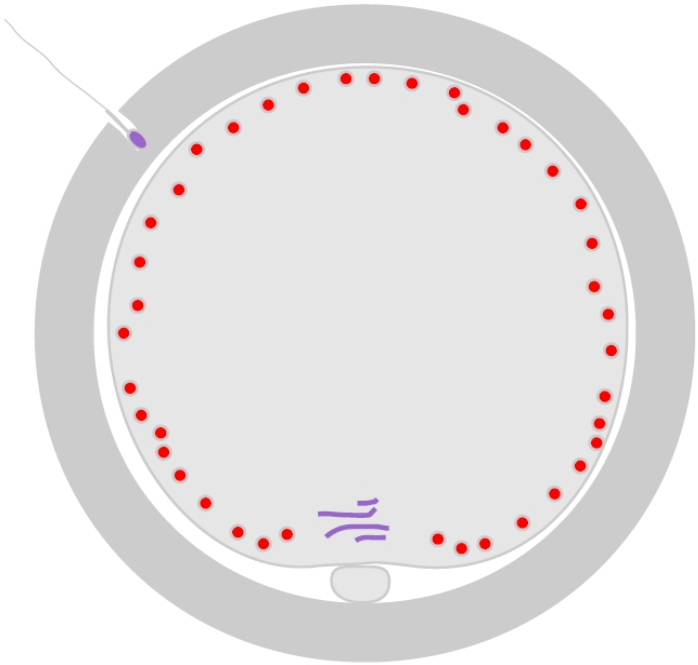
Oplození

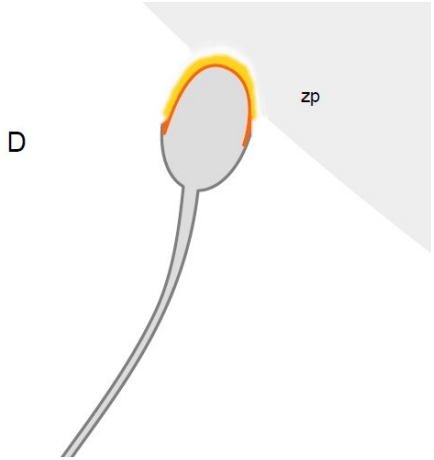



B
zp
Receptory ZP3 a ZP4
Progesteronový receptor
Molekula progesteronu

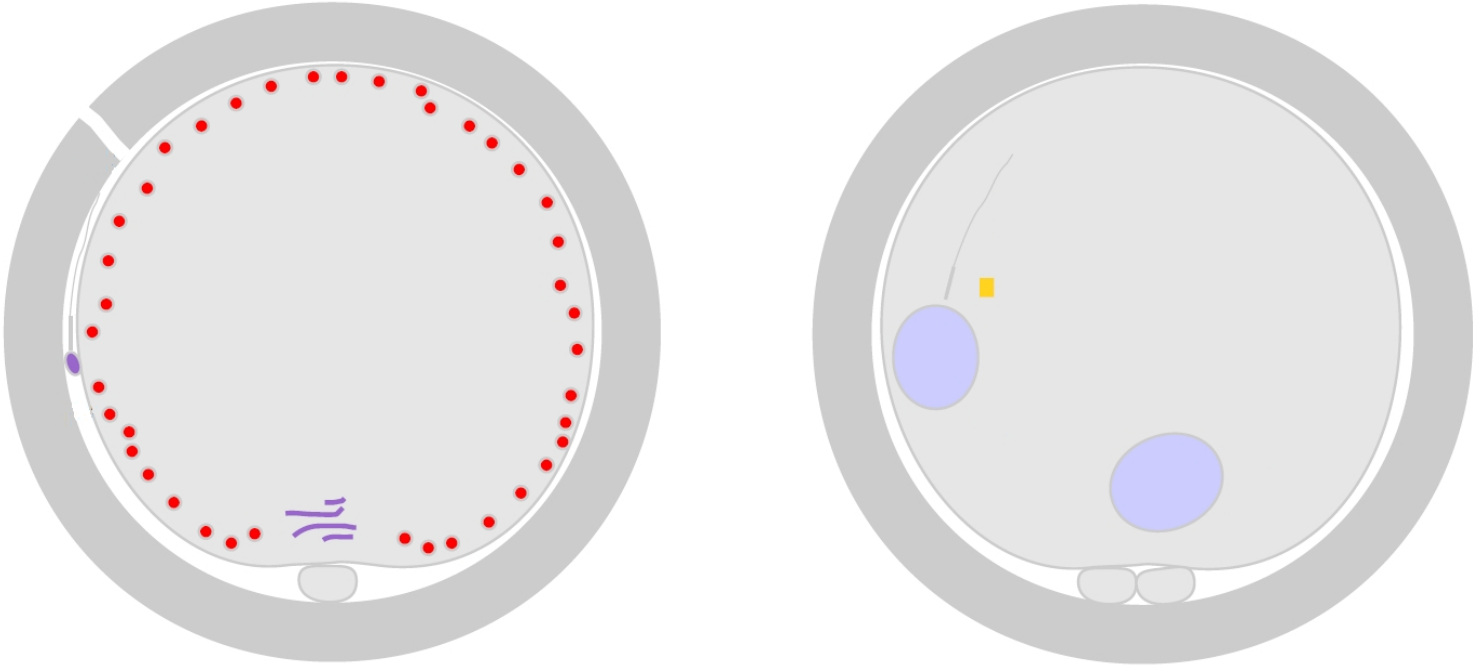

ao
zp
C

Oplození

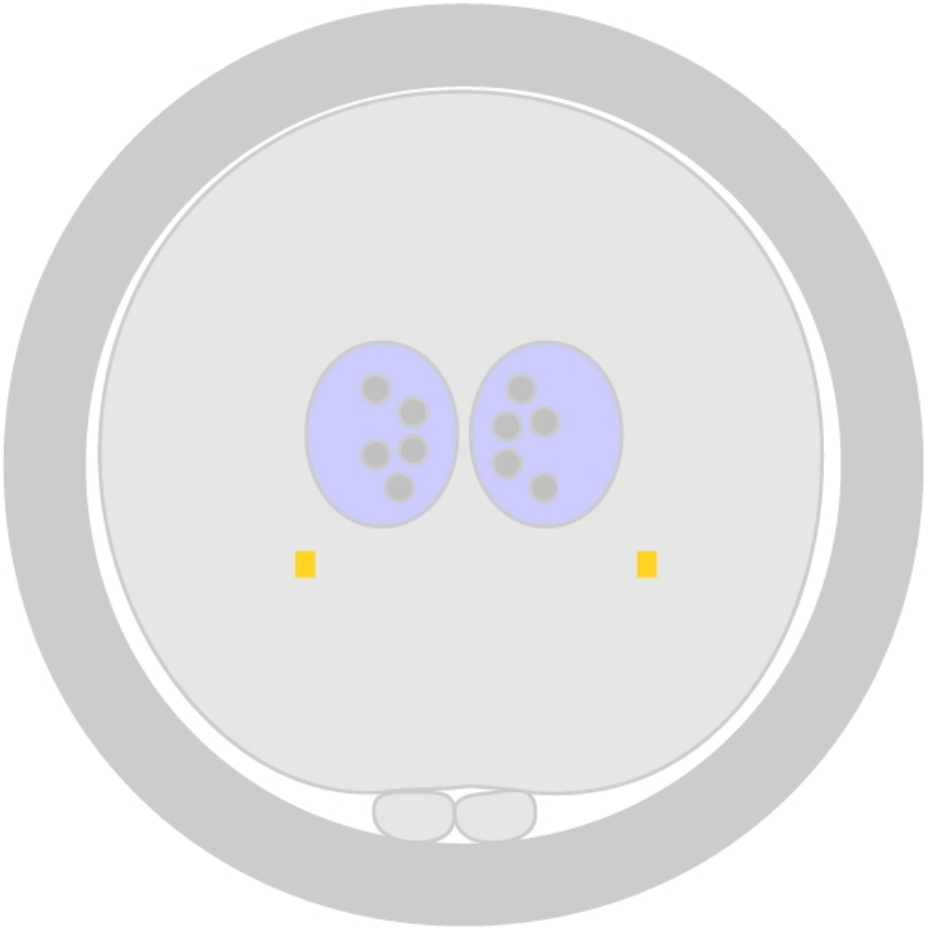




Oplození



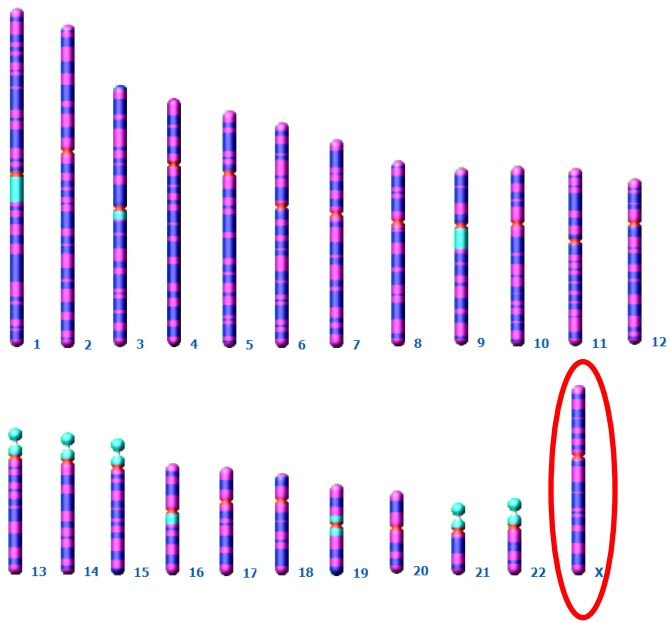
Oplození

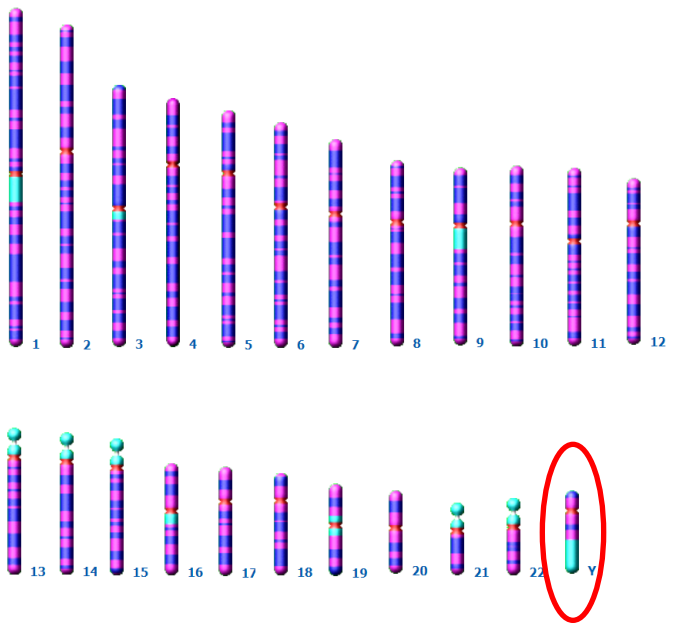


CO DÁVÁ NOVÉMU JEDINCI MATKA A CO OTEC?

Genetická a epigenetická informace není symetrická

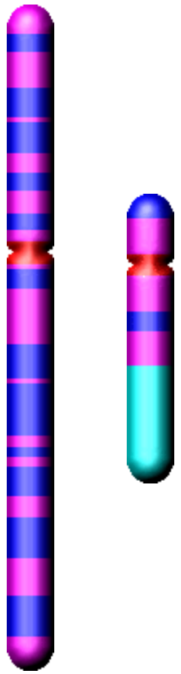
Jaderná genetická informace





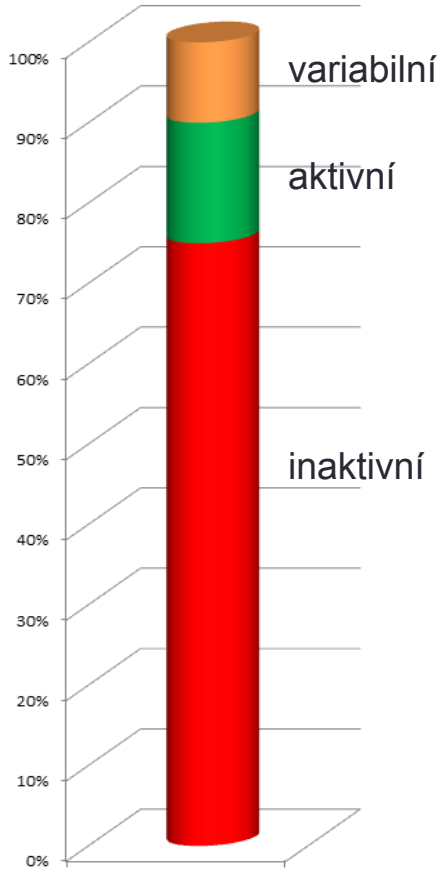
Chromozomy X a Y

- Chromozom Y zajišťuje diferenciaci pohlaví
- X a Y se liší v obsahu genů
- U 1 chromozomu X probíhá inaktivace



Inaktivace chromozomu X (lyonizace)

- Probíhá u sestavy se dvěma chromozomy X (žena, Klinefelterův sy) už v časném embryonálním vývoji.
- Asi 15% genů nepodléhá inaktivaci
- Asi 10% genů podléhá variabilní inaktivaci



Genomický imprinting

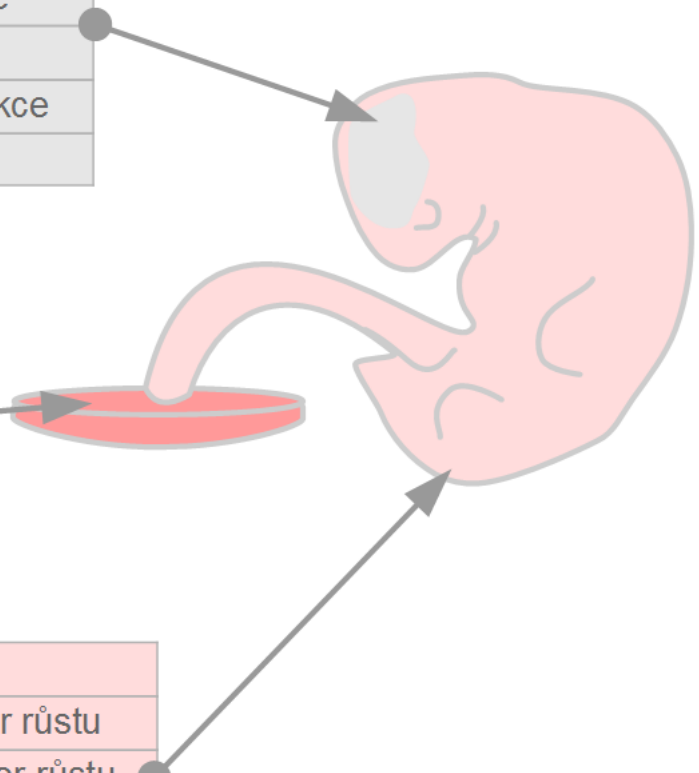
- Imprintované geny jsou transkribovány pouze z jedné alely, druhá alela genu je neaktivní – imprintovaná (metylace DNA)
- Aktivita určitého genu omezena na jeden chromozom v závislosti na tom, od kterého rodiče byl zděděn
- Imprintované geny se podílejí zejména na řízení embryonálního a novorozeneckého růstu a na vývoji mozku
- Je známo asi 150 imprintovaných oblastí chromozomů u člověka
- Deregulace imprintingu je příčinou četných lidských patologií, jako je gestační trofoblastická choroba, syndromy Prader-Willi, Angelman a Beckwith-Wiedemann, nádory …

Genomický imprinting

Gen	Exprese	Funkce
Peg3	paternální	Sexuálně specifické chování
Ndn	paternální	Prostorové učení, socializace
Grb10	paternální	Agresivita
Ube3a	maternální	Paměť, učení, motorické funkce
Nesp	maternální	Zkoumavé chování

Gen	Exprese	Funkce
Peg3	paternální	Růst
Peg1	paternální	Růst
Ascl2	paternální	Vývoj trofoblastu
Igf2 P0	paternální	Přenos živin
Phlda2	maternální	Restrikce trofoblastu
Cdkn1c	maternální	Restrikce trofoblastu
Slc22a3	maternální	Přenos monoaminů

Gen	Exprese	Funkce
Igf2	paternální	Všeobecný pozitivní regulátor růstu
H19	maternální	Všeobecný negativní regulátor růstu
Igf2r	maternální	Všeobecný negativní regulátor růstu
Grb10	maternální	Všeobecný negativní regulátor růstu



Podle Plasschaert a Bartolomei (2014)

Ribonukleové kyseliny

Oocyt

- mRNA
- rRNA
- nekódující RNA

Spermie

- několik stovek molekul převážně nekódující RNA

Proteiny

Oocyt

- **1376** proteinů

Spermie

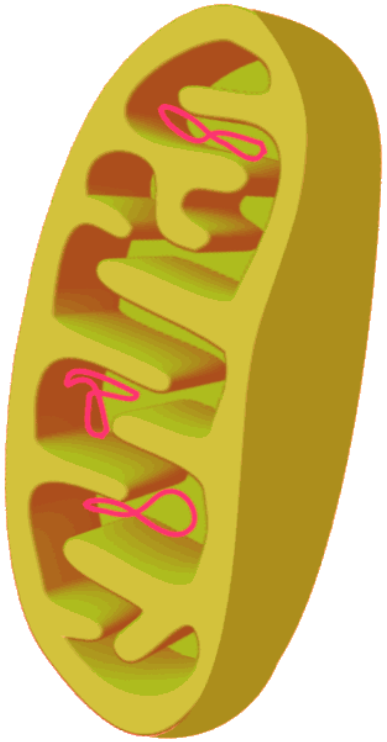
- **103** proteiny ovlivňují proces oplození
- **93** proteinů má vliv na další vývoj embrya

Buněčné dělení

- V oocytu nejsou centrioly, tuto strukturu řídící buněčné dělení získává zygota ze spermie.
- Centrioly, které máme ve všech somatických buňkách (a spermiích) jsou tedy otcovského původu

Mitochondriální genetická informace

- Mitochondrie získáváme výlučně od matky
- Mitochondrie ze spermií jsou aktivně zničeny



Původ genetických vad je asymetrický

Od otce

- Genové mutace vzniklé de novo u starších otců
- Strukturní chromozomové vady vzniklé de novo
- Segmentální chromozomové vady

Od matky

- Meiotické vady
- X – vázané mutace
- Mitochondriální mutace

ČASNÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ ČLOVĚKA

Kde probíhá, jak je úspěšný, co vyžaduje

Časný embryonální vývoj člověka

- Začíná prvním rýhovacím dělením
- Probíhá do 3. dne ve vejcovodu, potom v děložní dutině
- Vyžaduje
  - laktát nebo pyruvát jako zdroje energie, od 8b glukózu
  - aminokyseliny
  - bikarbonát
  - osmotickou koncentraci okolo 280 mmol/l
  - rozmezí pH 7,2 – 7,4
  - teplotu v rozmezí 36,5 – 37,5ºC
  - …
- Do 3. dne „funguje“ embryo převážně na mateřský genom

Časný embryonální vývoj člověka

Zygota

Den 1 ráno

Časný embryonální vývoj člověka

2b

Den 1- 2

Časný embryonální vývoj člověka

4b

Den 2 – v průběhu dne

Časný embryonální vývoj člověka

8b

Den 3

Časný embryonální vývoj člověka

Kompaktní morula

Den 4

Kompakce a vznik blastocysty

- Na přelomu 3. – 4. dne dojde k aktivaci embryonálního genomu
- 4. den dojde ke kompakci, tj. blastomery se přiloží těsně k sobě, vytvoří se pevná mezibuněčná spojení, hranice buněk nejsou ve světelném mikroskopu vidět.
- Postupně se začíná mezi buňky pumpovat tekutina, vzniká dutinka. Diferencuje se embryoblast a trofoblast.
- 5. den má časné embryo podobu časné blastocysty.
- Zdrojem energie se stává místo laktátu nebo pyruvátu glukóza, dochází k významným změnám ve struktuře buněk

Expanze a hatching blastocysty

- Do vzniklé blastocystové dutiny (blastocélu) jsou iontovou pumpou čerpány sodíkové ionty. Zvýšená koncentrace sodíkových iontů vede k průniku vody do blastocélu a zvyšování osmotického tlaku, takže blastocysta se rozpíná.
- Tlak působící na zonu vede k jejímu protržení a vyklubání blastocysty ze zony (6.-7. den)
- Blastocysta je připravena k nidaci.

Časný embryonální vývoj člověka

Časná blastocysta

Den 4 - 5

Časný embryonální vývoj člověka

Blastocysta

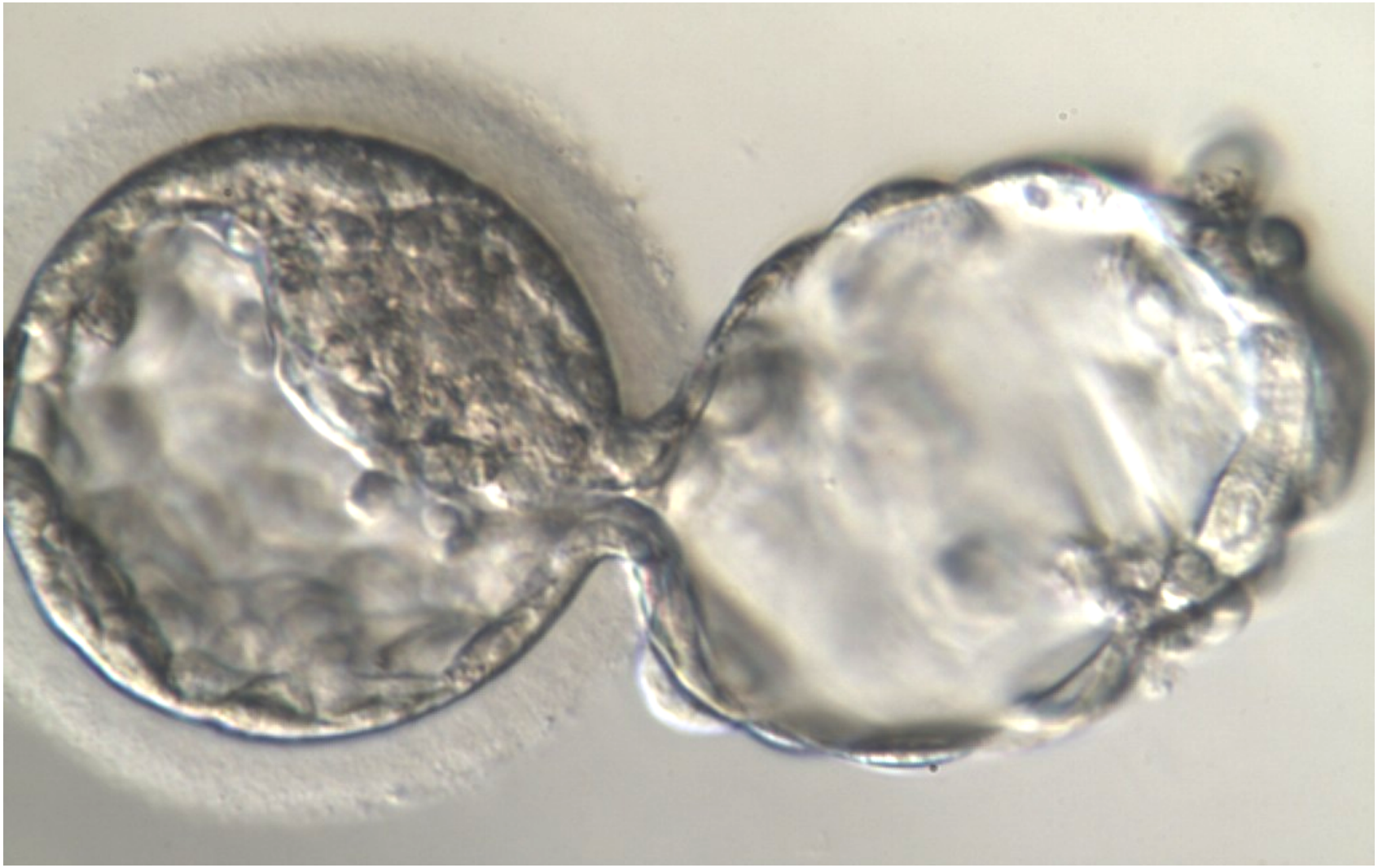
Den 4 - 5

Časný embryonální vývoj člověka

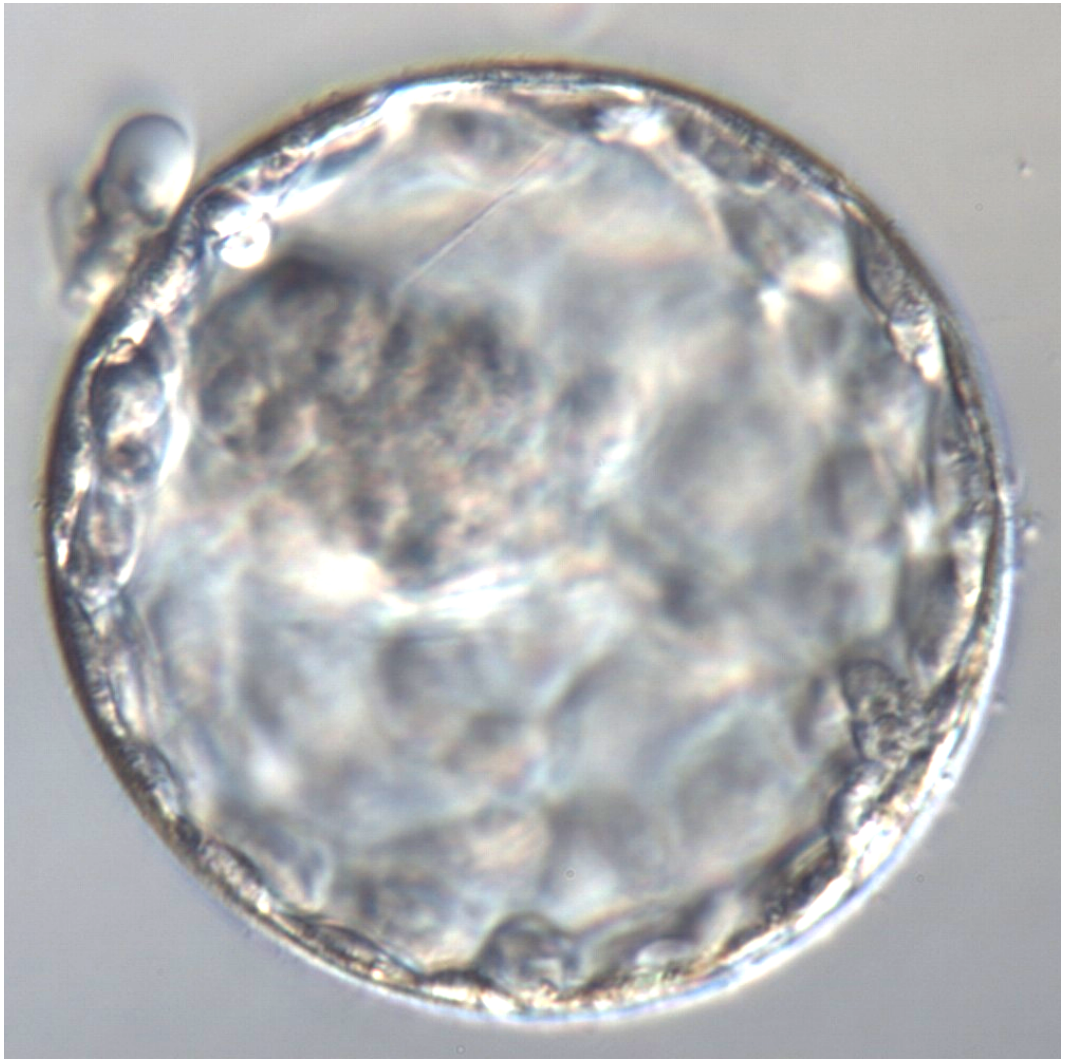
Expandovaná blastocysta

Den 5

Časný embryonální vývoj člověka



Časný embryonální vývoj člověka



Hatchovaná blastocysta

Den 6

Výsledek časného vývoje embryí

- Stadia vyklubané blastocysty dosáhne jak při vývoji *in vivo*, tak *in vitro* asi 60% embryí. Ostatní embrya zaniknou ještě v preimplantačním období.
- Důvodem zástavy vývoje embryí jsou meiotické a mitotické aneuploidie, dvouvláknové zlomy DNA v jádře spermií, homozygotní nebo složené heterozygotní letální kombinace genů …
- Jen asi 60% geneticky zdravých blastocyst se niduje. Důvodem může být snížená receptivita endometria, odchylky v HLA systému a další.

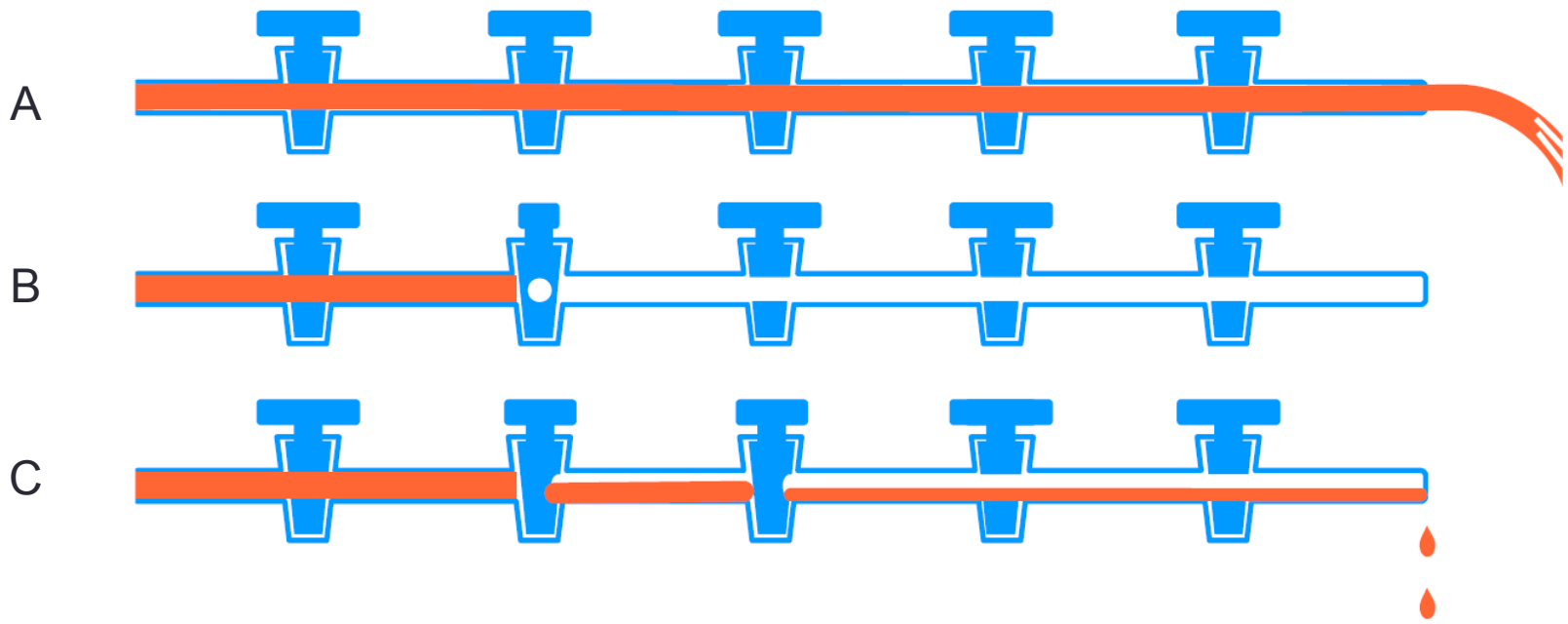
JAK JE TO S MUŽSKOU A ŽENSKOU NEPLODNOSTÍ

Co to je neplodnost, jaké jsou příčiny, historický vývoj

Jak je to s mužskou a ženskou neplodností

- Kolem 15% párů má problémy s početím dítěte, z těchto párů polovina mužů má parametry ejakulátu pod hranicí plodnosti
- Ve většině případů nejde o absolutní neplodnost, ale o kombinaci faktorů u obou partnerů snižující pravděpodobnost početí
- I u plodného páru jen asi každá čtvrtá zygota dospěje k porodu dítěte
- Asi 1% mužů má azoospermii

Kombinace faktorů



A – 100% B – 0% C – 25%

Plodnost páru

$$t_p = \frac{0{,}5}{p_1 . p_2}$$

- t_p – doba potřebná k otěhotnění v rocích
- p_1 – pravděpodobnost oplození u ženy
- p_2 – pravděpodobnost oplození u muže

$$t_p = \frac{0{,}5}{1.0{,}05} = 10 \text{ let}$$

např. pohyblivost spermií v 5. percentilu

Faktory nejvíce ovlivňující plodnost

U ženy

- věk
- obezita
- genetické faktory*
- kouření
- STD (chlamydie)

* včetně PCOS, endometriózy apod.

U muže

- genetické faktory*
- kouření
- anabolika
- vliv teploty
- věk

* včetně varikokély apod.

Zhoršuje se plodnost?

- Žádná seriózní publikace neprokázala zásadní zhoršování plodnosti mužů ani žen
- Zprávy o zásadním poklesu mužské plodnosti vznikly na základě dvou publikací, z nichž první už autoři odvolali. Výsledky obou prací byly ovlivněny hrubými metodickými chybami a neznalostí problematiky.
- Jediným závažným faktorem, zhoršujícím plodnost, je posouvání otěhotnění do vyšších věkových kategorií.

SPONTÁNNÍ POTRÁCENÍ A JEHO PŘÍČINY

Jaké jsou hlavní příčiny spontánního potrácení, jak je časté

Spontánní potrácení a jeho příčiny

- Jen menší část oplozených vajíček se vyvine do stadia blastocysty
- Značná část těhotenství končí ještě předtím, než je gravidita zjištěna, projeví se odloženou menstruací.
- Asi 10 – 15% **zjištěných** těhotenství končí spontánním potratem.

Příčiny:

- Asi v 75% jsou příčinou těhotenské ztráty aneuploidie nebo strukturní chromozomové vady
- Na zbytku se podílejí například trombofilní mutace, polymorfizmy v HLA systému a jiné

NOVÉ METODY ASISTOVANÉ REPRODUKCE A REPRODUKČNÍ GENETIKY

Smysl mají takové metody, jimž dokonale rozumíme a ovládáme je a podstatně ovlivňují výsledek

Nové metody asistované reprodukce a reprodukční genetiky

- Prekoncepční genetické testování
- Preimplantační genetické testování
- Selekce spermií
- Vyšetření oocytů v polarizovaném světle
- Semikontinuální záznam vývoje embryí
- Vyšetření receptivity endometria

Prekoncepční genetické testování

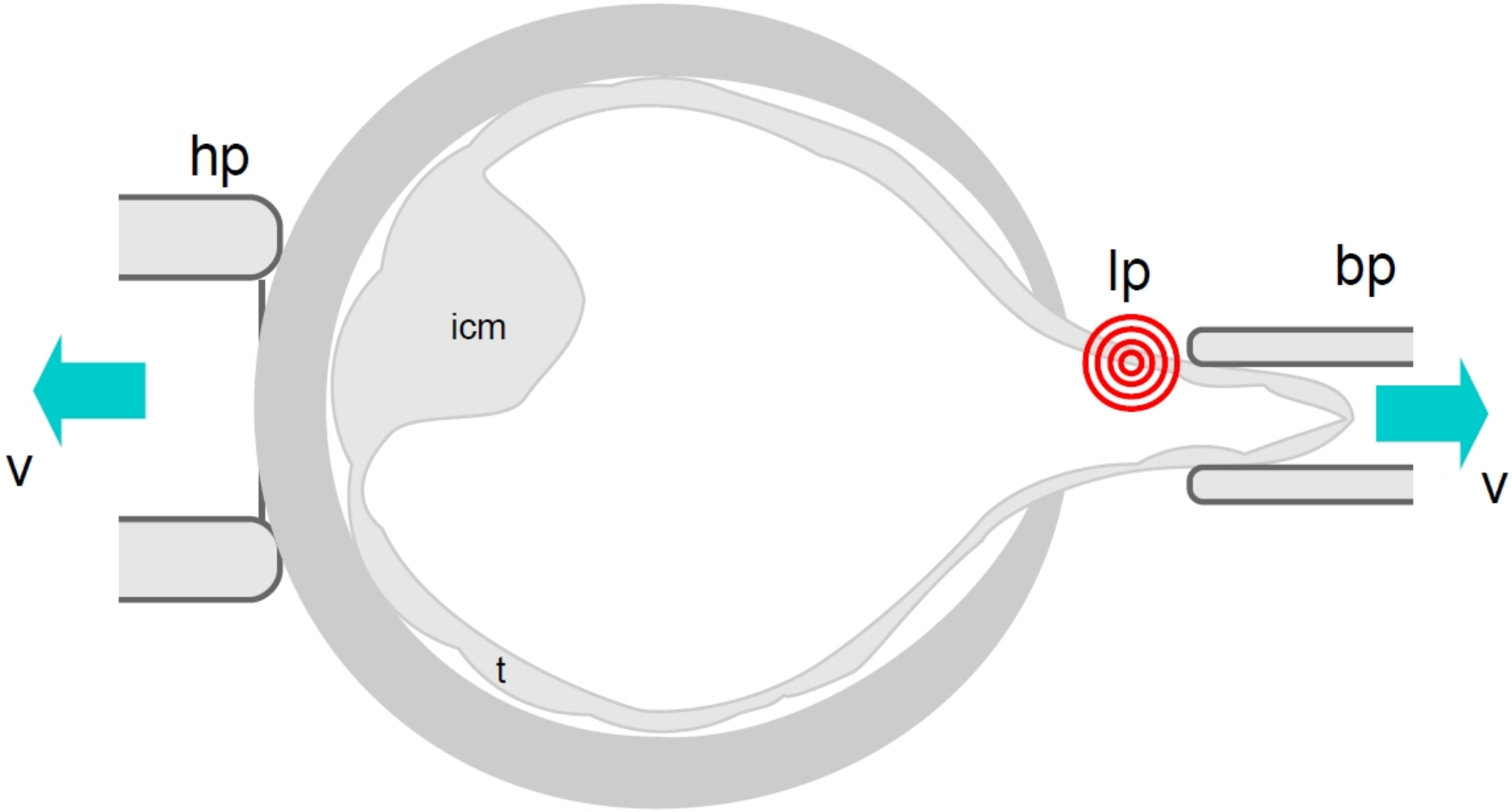
- Složka cytogenetická – **karyotyp**
- Složka molekulárně genetická – **panely** vyšetření pro standardizované testování pomocí MPS (NGS):
  - Zjišťování nosičství závažných genetických onemocnění (cystická fibróza, spinální muskulární atrofie …)
  - Zjišťování některých genetických příčin neplodnosti (receptor pro androgeny, mikrodelece na chromozomu Y …)
  - Zjišťování polymorfizmů ovlivňujících reakci na léčbu (receptory pro FSH, LH …)

Preimplantační genetické testování

- PGT – A (pgt aneuploidií)
- PGT – M (pgt monogenních chorob)
- PGT – SR (pgt strukturních chromozomových vad)

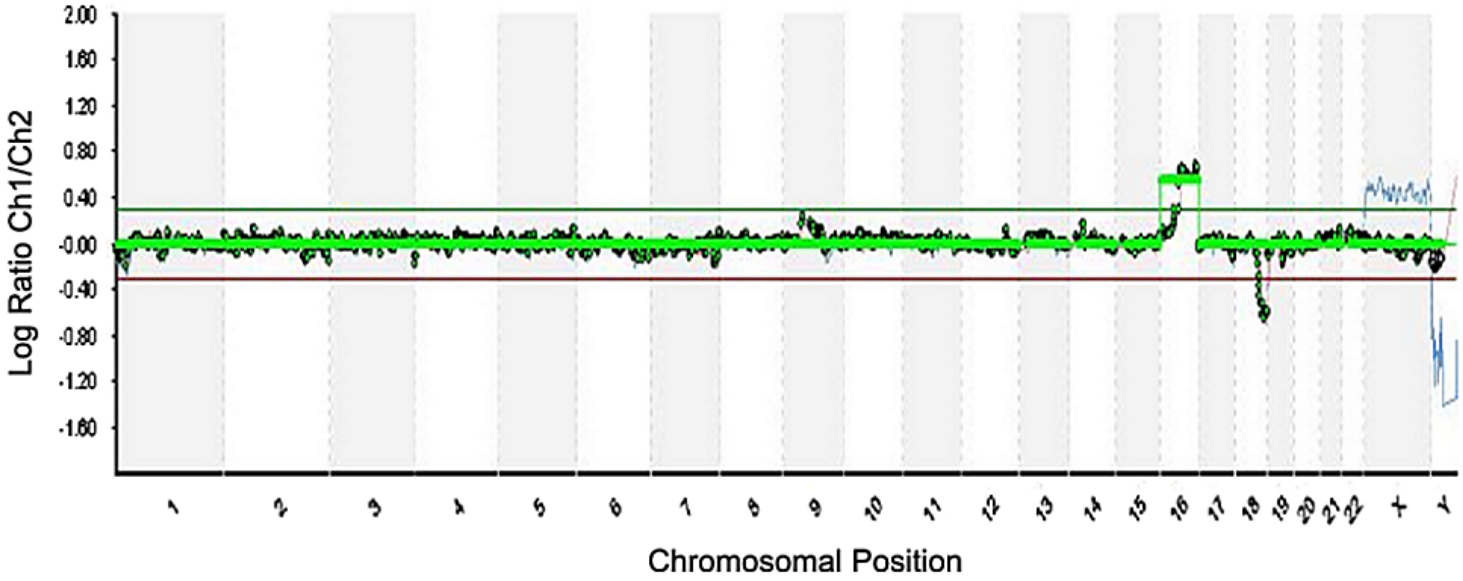
- odběr vzorku (několik buněk trofoblastu)
- lýza buněk
- celogenomová amplifikace DNA
- MPS
- vyhodnocení

Preimplantační genetické testování



PGT – A

- Cílem je zjištění přítomnosti genomových mutací (odchylek v počtu chromozomů)
- Výsledkem vyšetření je křivka znázorňující počet jednotlivých chromozomů (monosomie, trisomie …)



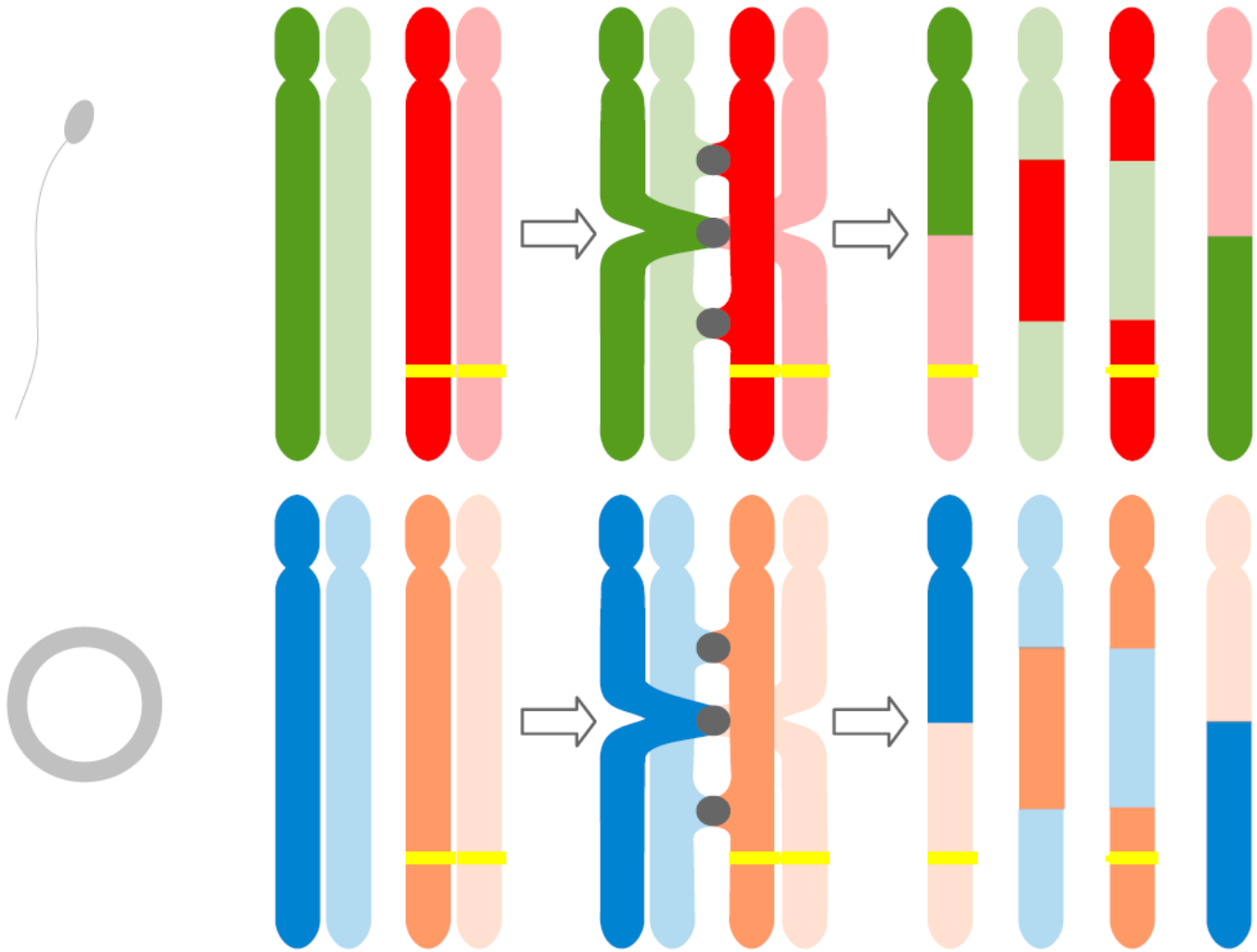
PGT – A

- Smyslem vyšetření je:
  - Zvýšit podíl implantujících se embryí
  - Snížit podíl samovolných potratů
  - Zabránit vzniku poroditelných vad na základě aneuploidií (trisomie 13, 18, 21)

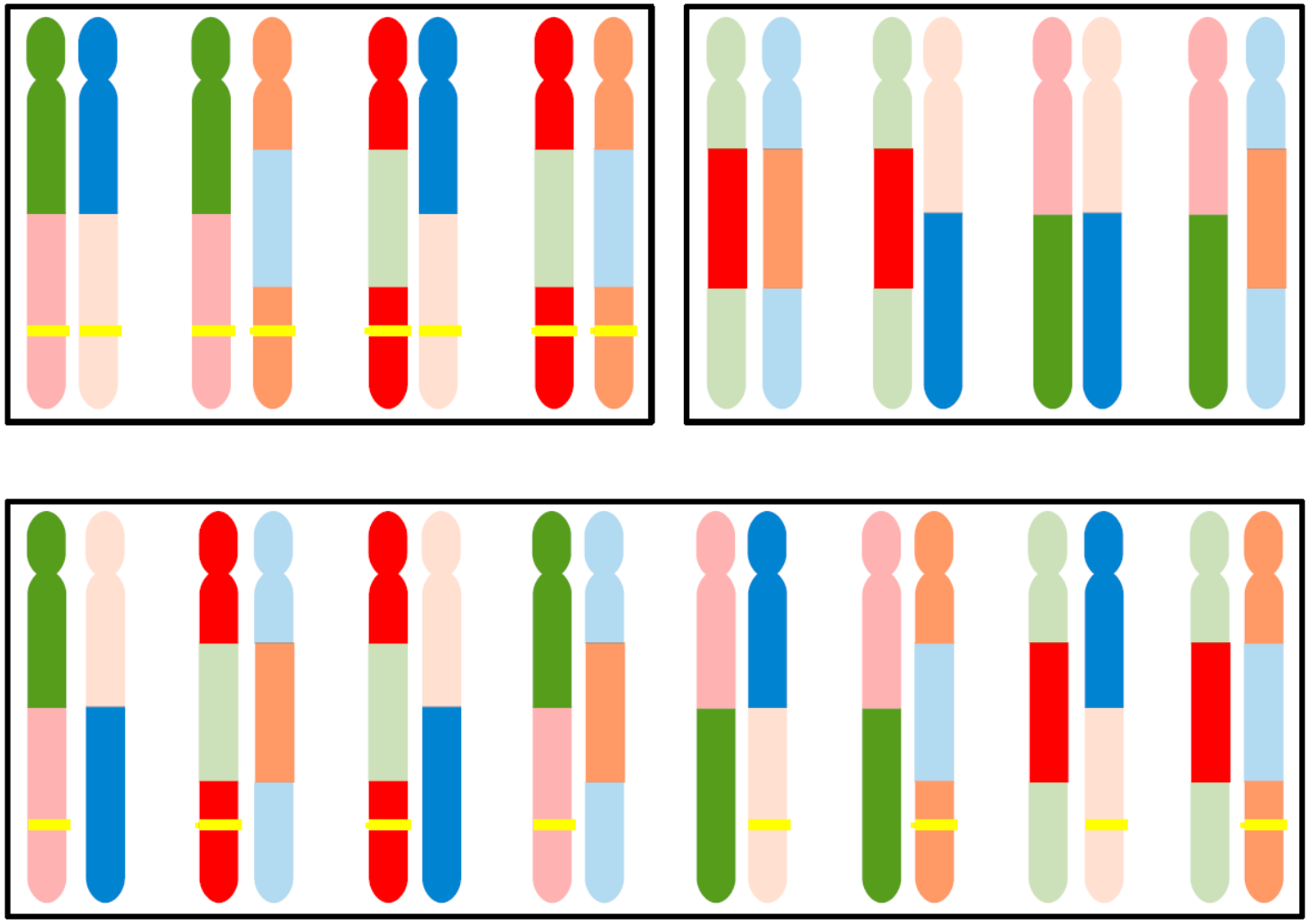
PGT – M

- **Cílem vyšetření** je zjištění, zda embryo obsahuje hledanou genovou mutaci
- Optimální používanou metodou je karyomapping
- **Metoda** je založena na sestavení mapy rozmístění haplotypů (typické rozmístění nekódujících úseků chromozomů). Zjišťuje se, která část chromozomu v daném embryu je zděděna od kterého z rodičů, evtl. prarodičů a zda tedy obsahuje mutovaný gen.
- **Výstupem metody** je mapa chromozomů s určením původu jejich částí.
- **Smyslem metody** je vybrat embrya, neobsahující hledanou mutaci a zabránit tak vzniku dědičného onemocnění.

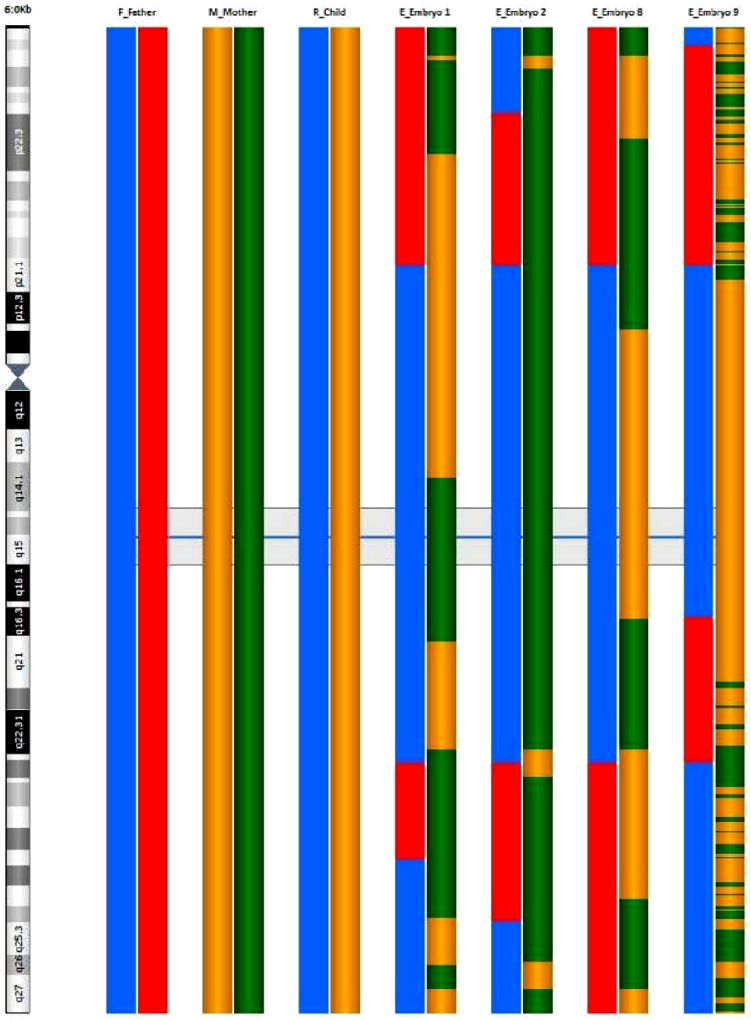
Karyomapping



Karyomapping



Karyomapping



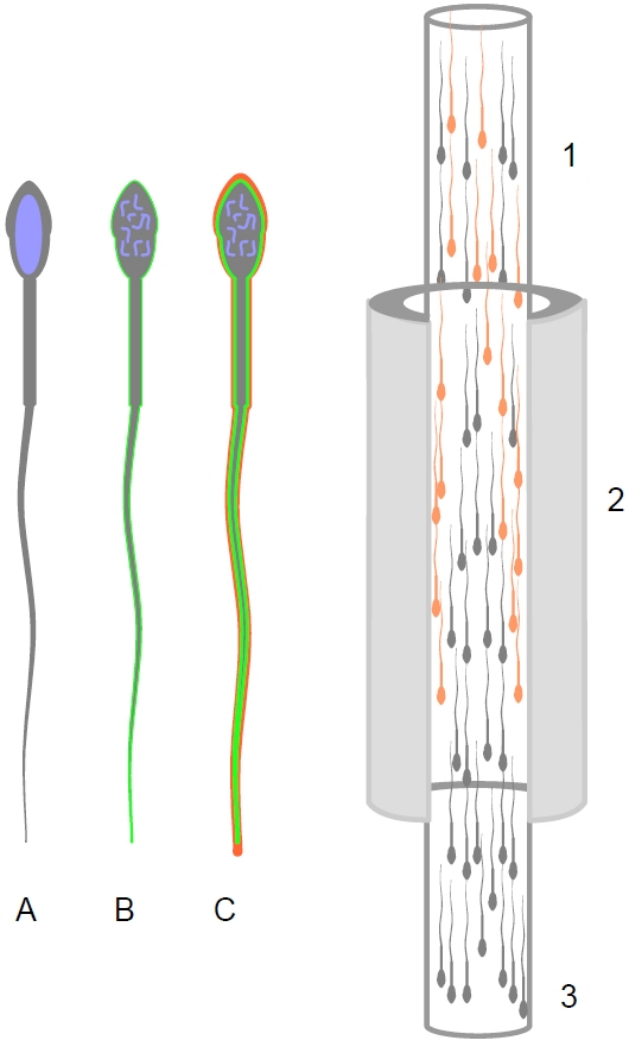
PGT – SR

- **Cílem metody** je zjistit, zda dané embryo obsahuje nebalancovanou, případně i balancovanou chromozomovou mutaci (strukturní vadu)
- Používají se **stejné postupy**, jako u **detekce aneuploidií** (zachytí nebalancovanou vadu) nebo **karyomapping** (může zachytit i balancovanou vadu)
- **Smyslem vyšetření** je vyloučit embrya nesoucí nebalancovanou vadu, která by vedla k potratu nebo narození postiženého dítěte.

Selekce spermií

- Existuje možnost redukovat podíl spermií s vysokou fragmentací DNA. Velké množství dvouvláknových zlomů DNA ve spermii vede k zástavě vývoje embrya.
- Spermie s velkým podílem fragmentace (důsledek apoptózy) mají odlišné vlastnosti cytoplazmatické membrány – externalizují fosfatidylserin. Na fosfatidylserin se váže anexin V.
- Pomocí anexinu V vázaného na feromagnetické částice jsou označeny spermie se zlomy a poté zachyceny na magnetické koloně.

Selekce spermií



A. Normální spemie

B. Spermie s vysokou fragmentací

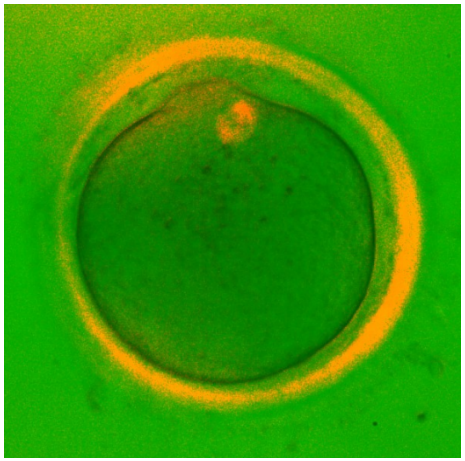
C. Spermie s magneticky značeným anexinem V, navázaným na membránový fosfatidylserin

1. Směs fragmentovaných a nefragmentovaných spermií
2. Magnetická kolona
3. Suspenze očištěných spermií

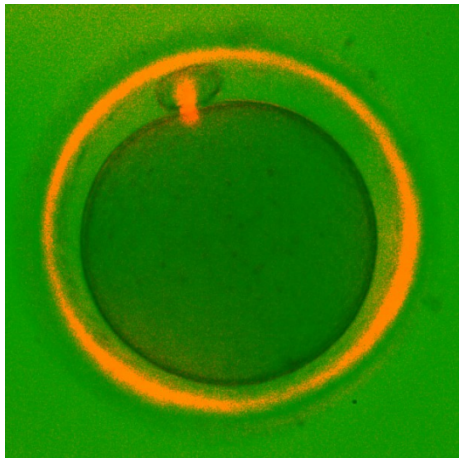
Vyšetření oocytů v polarizovaném světle

- V polarizovaném světle lze pozorovat dvojlomné struktury, v případě oocytu je to dělící vřeténko a vnitřní vrstva zony.
- Pozorování v polarizovaném světle umožňuje vyhodnotit stadium meiotického dělení a strukturu vnitřní vrstvy zony.
- Vyhodnocení stadia meiotického dělení umožňuje správně načasovat injekci spermie do metafáze II.
- Struktura vnitřní vrstvy zony informuje o tom, zda vývoj oocytu proběhl normálně.

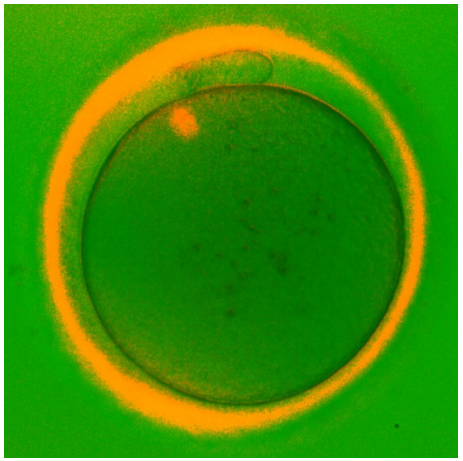
Pozorování v polarizovaném světle



Anafáze I

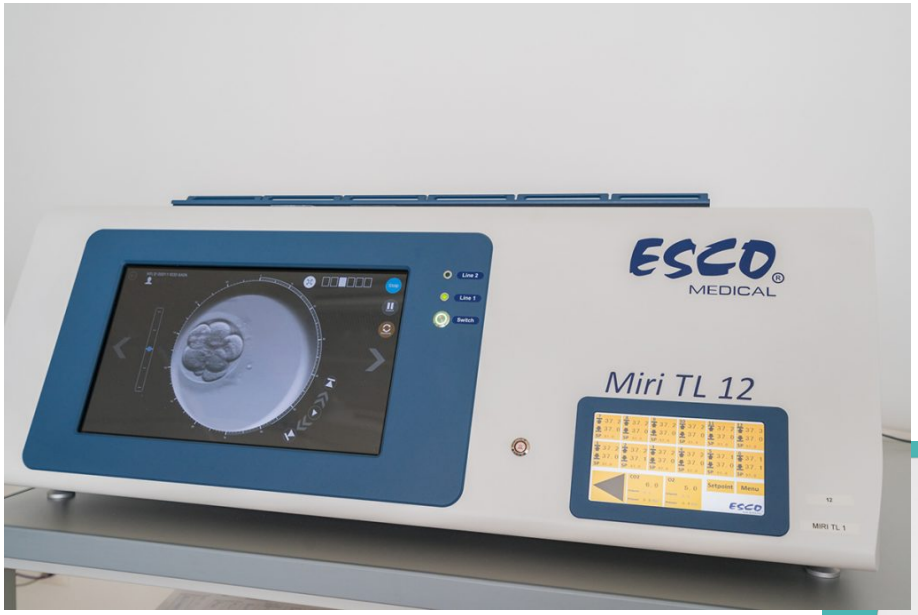


Telofáze I



Metafáze II

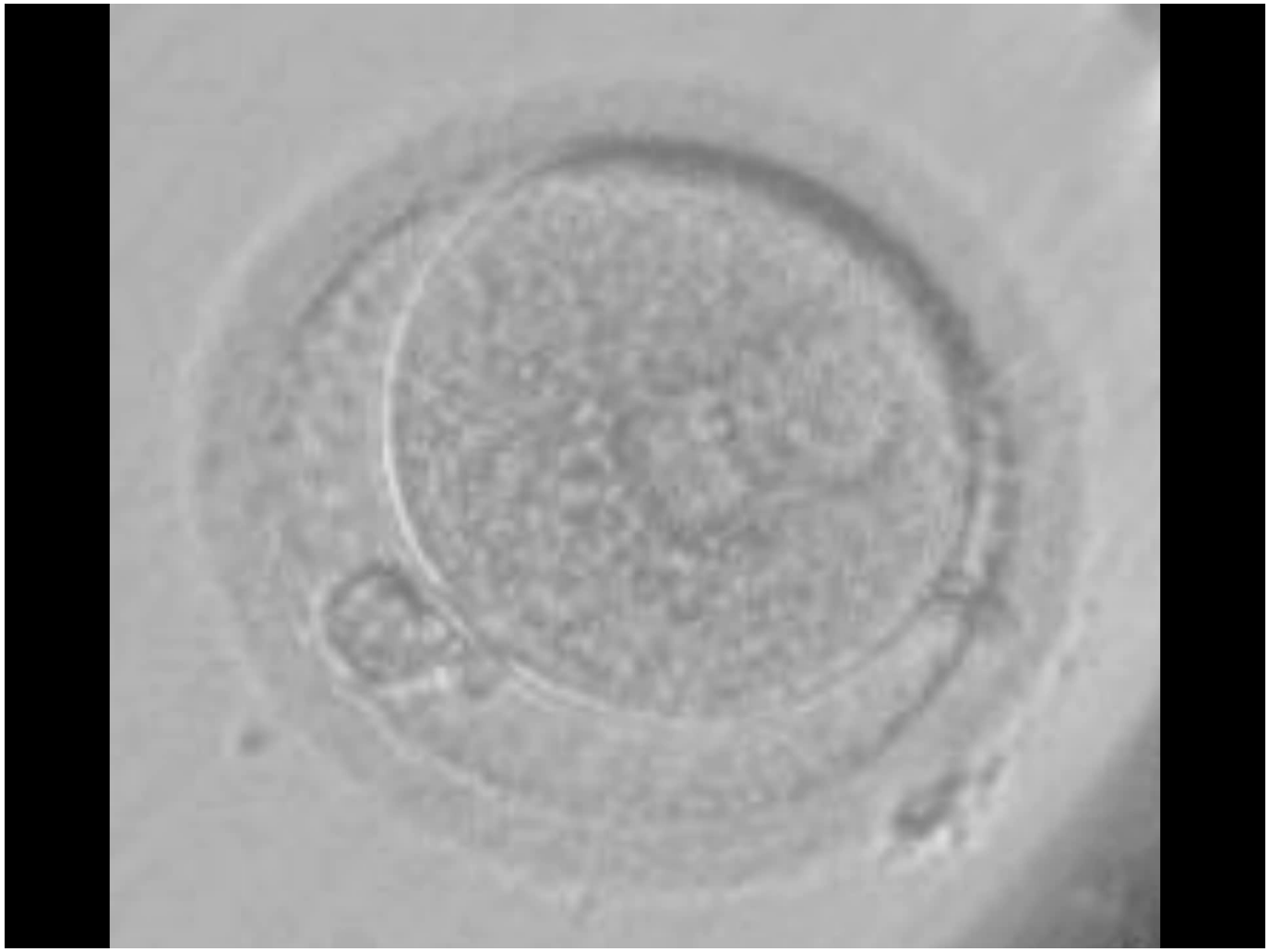
Semikontinuální záznam z vývoje embryí



Semikontinuální záznam z vývoje embryí

- Záznam se provádí snímkováním kamerou přímo v inkubátoru
- Používají se velmi krátké expozice v intervalu 5 – 15 minut při osvětlení o malé energii.
- Snímky se ukládají na disk a umožňují v kterékoliv fázi vývoje prohlédnout i po jednotlivých snímcích zpětně celý záznam.
- Dá se tak spolehlivě zjistit například přítomnost dvou prvojader, pravidelnost buněčného dělení, čas a trvání mitóz.

Semikontinuální záznam vývoje embryí



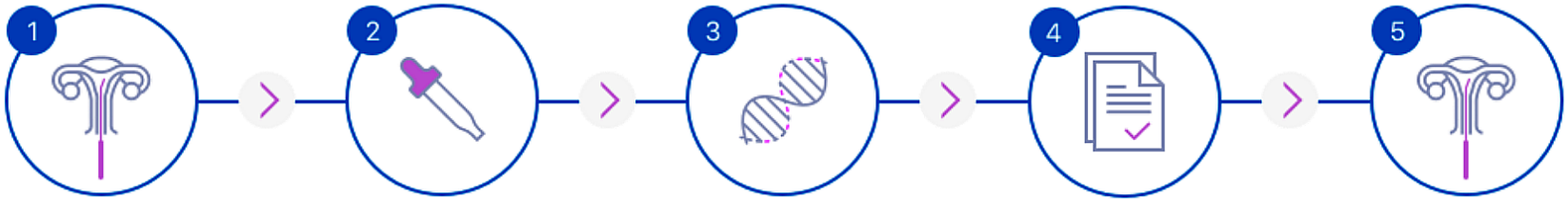
Vyšetření receptivity endometria

Úspěch implantace embrya se skládá v principu ze tří složek:

- Kvalita embrya
- Receptivita děložní sliznice - schopnost endometria přijmout embryo*
- Technika transferu (výcvik gynekologa – reproduktologa, sonografická kontrola)

* Receptivita (implantační okno) se zjišťuje analýzou transkripce v buňkách endometria

Vyšetření receptivity endometria



Šetrná biopsie | Extrakce RNA | Analýza NGS | Protokol s doporučením | Transfer embrya

- Biopsie se provádí za stejných podmínek jako pozdější transfer
- Výsledek je platný asi 3 měsíce
- Výsledný protokol:
  - Nereceptivní
  - Prereceptivní
  - Receptivní
  - Postreceptivní

Děkuji Vám za pozornost