

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Zuzana Kosařová

Korelace morfokinetických parametrů s chromozomální výbavou lidských preimplantačních
embryí

Correlation of morphokinetic parameters of human preimplantation embryos with their
chromosomal status

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MVDr. Ladislava Jelínková, CSc.

Praha, 2021

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat mé vedoucí práce MVDr. Ladislavě Jelínkové, CSc. za trpělivost, cenné rady a odborné vedení při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala mé mamince RNDr. Marcele Kosařové, Ph.D. za přiblížení genetických metod používaných při vyšetřování embryí. Mé díky patří také doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. za vstřícný přístup.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2021

Podpis _____

Abstrakt:

Značná část lidských preimplantačních embryí je aneuploidní. Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) umožňuje vyšetřit počet chromozomů v několika buňkách trofektodermu odebraných z vyvíjejících se embryí a pro transfer jsou pak doporučena pouze embrya euploidní. Biopsie buněk trofektodermu je invazivní metoda, vyšetření je nákladné a není prováděno u všech pacientek. Proto jsou hledány neinvazivní metody určení nejkvalitnějších embryí. Kontinuální monitoring v time-lapse systému umožňuje sledovat morfokinetické parametry embryonálního vývoje a díky tomuto neinvazivnímu přístupu jsou vybrána nejlépe se vyvíjející embrya s dobrou prognózou pro úspěšnou implantaci. Stále je zde ale otázka, zda a jak spolu morfokinetické parametry a ploidie embrya korelují. Z většiny studií na toto téma vyplývá, že k výběru nejkvalitnějšího embrya je ideální kombinace obou těchto přístupů.

Klíčová slova: lidské embryo, time-lapse, morfokinetické parametry, biopsie, preimplantační genetické testování (PGT), aneuploidie

Abstract:

A significant amount of human preimplantation embryos is aneuploid. Preimplantation genetic testing of aneuploidies (PGT-A) enables us to examine the number of chromosomes in a few trophoctoderm cells biopsied from developing embryos, and only euploid embryos are then recommended to be transferred. Biopsy of trophoctoderm cells is an invasive method, PGT is quite expensive, the examination is not performed at all patients. Therefore, non-invasive methods for determining the highest quality embryos are searching. Non-invasive continual monitoring in a time-lapse system is able to observe the morphokinetic parameters of embryonic development, and can select the best developing embryos with a good prognosis for successful implantation. However, there is still the question of whether and how morphokinetic parameters and embryonic ploidy correlate. Most studies on this topic show that a combination of both of these approaches is the best way for selecting the highest quality embryo for transfer.

Key words: human embryo, time-lapse, morphokinetic parameters, biopsy, preimplantation genetic testing (PGT), aneuploidy

Seznam zkratek:

aCGH	array comparative genomic hybridization
AR	assisted reproduction
AZF	azoospermia factor
BAC	bacterial arteficial chromosome
CGH	comparative genomic hybridization
DNA	deoxyribonukleotide acid
eSET	elective single embryo transfer
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
ET	embryotransfer
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization
ICM	inner cell mass
ICSI	intracytoplasmic sperm injection
IUI	intrauterine insemination
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KET	kryoembryotransfer
MII	metaphase II
MESA	microsurgical epididymal sperm aspiration
NGS	next generation sequencing
PB	polar body
PGDIS	Preimplantation Genetic Diagnosis International Society
PGT	preimplantation genetic testing
PGT-A	preimplantation genetic testing of aneuploidies
PGT-M	preimplantation genetic testing of monogenic diseases
PGT-SR	preimplantation genetic testing of structural rearrangements
PICSI	preselected intracytoplasmic sperm injection
PCO	polycystic ovary syndrome
RNA	ribonucleic acid

SNP	single nucleotide polymorphism
TE	trophectoderm
TESE	testicular sperm extraction
TLS	time-lapse system

Obsah

1	Úvod	1
2	Asistovaná reprodukce	2
2.1	Cíle asistované reprodukce.....	3
2.2	Příčiny neplodnosti	3
2.2.1	Mužské faktory infertility	3
2.2.2	Ženské faktory infertility	4
2.3	Základní embryologické metody v AR	4
2.3.1	IUI	4
2.3.2	Ovariální stimulace a punkce	4
2.3.3	IVF.....	5
2.3.4	ICSI, PCSI	5
2.3.5	MESA, TESE	6
2.3.6	Kontinuální monitorování vývoje embryí.....	6
2.3.7	Embryotransfer	8
2.3.8	Kryokonzervace buněk a tkání v procesu IVF.....	8
2.3.9	Biopsie	9
3	Raný vývoj preimplantačních embryí.....	9
3.1	Oplození.....	9
3.2	Fáze rýhování časného embrya	10
3.3	Fáze kompaktace	10
3.4	Fáze blastocysty.....	10
3.5	Hodnocení embryí	10
4	Chromozomální abnormality v preimplantačních embryích	13
5	Preimplantační genetické testování embryí (PGT)	14
6	Korelace vývoje preimplantačních embryí s jejich chromozomální výbavou.....	18
7	Korelace výstupu z time-lapse s výsledky PGT-A ve sledovaném souboru 177 embryí ...	21
8	Závěr.....	26
9	Seznam použité literatury	27
10	Internetové zdroje.....	33

1 Úvod

Stále více párů se potýká s neplodností a jejich cesta za vytouženým dítětem může být velmi dlouhá. Pomoc jim mohou nabídnout kliniky asistované reprodukce. Asistovaná reprodukce používá metody pro práci se spermiemi, oocyty, embryi, ovariální či testikulární tkání. Od narození prvního „dítěte ze zkumavky“ v roce 1978 prošlo toto odvětví medicíny velkým rozvojem. Neplodnost je problém komplexní, týká se vždy páru muže a ženy a na její léčbě se podílí řada odborníků: gynekolog, urolog, embryolog, androlog, klinický genetik, hematolog, imunolog, psycholog. Prvním krokem k léčbě neplodnosti je zjištění její příčiny u konkrétního páru. Gynekologické vyšetření ženy a vyšetření spermioqramu muže se provádí vždy před zahájením léčby. Doporučená je také konzultace páru s klinickým genetikem, který indikuje vyšetření karyotypu, případně další vyšetření se vztahem k neplodnosti. Gynekolog na základě výsledků všech vyšetření doporučí postup další léčby.

Většina pacientů v IVF centrech podstupuje mimotělní oplození. Pacientka je hormonálně stimulována, aby dozrál větší počet oocytů, které jsou následně oplozeny v laboratoři spermiemi partnera či donora. Rozhodující je přenos kvalitního embrya s dobrým potenciálem pro další vývoj. Základním postupem při hodnocení kvality embryí je posouzení jejich morfologických a morfokinetických vlastností. Embryolog pravidelně hodnotí, zda parametry embryí odpovídají vývojovému stupni v daném čase.

Velké množství embryí bývá i v přirozených cyklech abnormálních. Jednou z hlavních příčin reprodukčních neúspěchů jsou chromozomální abnormality. Euploidní lidská somatická buňka obsahuje 23 párů chromozomů. Pokud některý chromozom chybí nebo naopak nadbývá, hovoříme o numerických chromozomálních aberacích – aneuploidii. Aneuploidie se vyskytují běžně v raných embryích a mohou pocházet z oocytu či spermie (aneuploidie meiotického původu) nebo vznikají v prvních mitotických děleních embrya. S věkem ženy stoupá počet aneuploidních oocytů, a vzniklá aneuploidní embrya jsou nejčastější příčinou abortů a neúspěšných implantací.

Při léčbě neplodnosti je základem úspěchu výběr kvalitního embrya s maximální šancí na úspěšnou implantaci a další správný vývoj. Cílem léčby neplodnosti není jen to, aby žena otěhotněla, ale především to, aby donosila a porodila zdravé dítě. Dnes jsou v centrech asistované reprodukce běžně používány postupy a metody, které umožňují tohoto cíle

dosáhnout. Pro výběr kvalitních embryí je používán vypracovaný systém hodnocení podle vybraných morfologických a embryologických parametrů, který spolu s kontinuálním sledováním vývoje embrya (time-lapse systémy) umožňuje výběr nejkvalitnějšího embrya z embryologického pohledu. Ve spojení s preimplantačním genetickým testováním embryí (PGT) je tento kombinovaný přístup tím nejlepším, co v současné době kliniky asistované reprodukce nabízejí. Tento postup je plně v souladu se snahou odborníků redukovat počet přenášených embryí, a tím i počet rizikových vícečetných těhotenství. Přenos pouze jednoho embrya, tzv. elektivní single-embryo transfer (eSET), může být úspěšný pouze v případě, že přenášené embryo je opravdu kvalitní.

Cílem práce je porovnat stupeň korelace mezi pozorovanými parametry vývoje embryí v time-lapse kultivacích a mezi výsledky PGT-A, které byly publikovány ve studiích zpracovaných v této bakalářské práci. Dále analyzovat vlastní vzorek embryí kultivovaných v time-lapse systému Geri® a vyšetřených na přítomnost aneuploidií metodou NGS. Výsledky získané analýzou vlastního souboru porovnat s výsledky z literatury.

2 Asistovaná reprodukce

Asistovaná reprodukce je lékařská disciplína napomáhající neplodným párům k početí a narození potomka. Louise Joy Brown byla prvním „dítětem ze zkumavky“, které se narodilo po *in vitro* fertilizaci v roce 1978 ve Velké Británii. Za tímto úspěchem stáli lékař Patrick Steptoe a vědec Robert Edwards, který získal v roce 2010 Nobelovu cenu za medicínu. Na celém světě je nyní již přes 8 milionů narozených dětí, které nebyly počaty přirozenou cestou (Calhaz-Jorge et al. 2020; Steptoe a Edwards 1978; Zhao et al. 2011).

Počet neplodných párů, pro které je umělé oplodnění jedinou cestou k narození zdravého dítěte, stále stoupá zejména ve vyspělých zemích. Důvodů, proč se mnohým párům nedaří otěhotnět, je celá řada: nezdravý životní styl, vysoká míra stresu, zhoršené životní prostředí. Velmi výrazným faktorem je cílené odkládání koncepce do vyššího věku ženy. Antikoncepce zásadně změnila pohled společnosti na zakládání rodiny. Páry oddalují svou reprodukci kvůli osobní kariéře a následné pokusy o početí již kvůli zralejšímu věku ženy nemusí být úspěšné (Cousa, Hasan, a Barber 2020; De Geyter 2019).

2.1 Cíle asistované reprodukce

V minulosti bylo ženě v jednom cyklu přenášeno více embryí, aby se zvýšila pravděpodobnost otěhotnění. Výsledkem tohoto postupu je velký počet vícečetných těhotenství, která jsou značně riziková: je zde vyšší procento potratů, předčasných porodů a dalších komplikací pro matky i vyvíjející se plody. Problémy s tímto spojené vedly k zavedení postupů AR, které minimalizují počet vícečetných těhotenství. Současné metody AR již umožňují vybrat nejkvalitnější embrya s vysokou šancí na další úspěšný vývoj a v jednom cyklu přenést ženě pouze jedno embryo (Tiitinen 2019). Ženy vyššího věku se mnohdy rozhodnou pro přenos dvou embryí, aby se zvýšila pravděpodobnost uchycení alespoň jednoho z transferovaných embryí (Ubaldi et al. 2015).

2.2 Příčiny neplodnosti

Neplodnost postihuje odhadem 15-20 % párů v reprodukčním věku na celém světě. O neplodnosti páru začínáme hovořit, jestliže se mu po dobu 12 měsíců pravidelného nechráněného pohlavního styku nedaří počít. Přibližně čtvrtina případů neplodnosti je způsobena výhradně problémem ze strany muže, ale ve zhruba polovině případů je důvodem neplodnosti souhra mužského i ženského faktoru. To, co výrazně ovlivňuje naději na spontánní otěhotnění, jsou hlavně věk ženy, genetické faktory, délka snahy o koncepci a také různá onemocnění, která mohla plodnost pacientů ovlivnit (Agarwal et al. 2021; Coussa, Hasan, a Barber 2020; Vander Borgh a Wyns 2018; Zorrilla a Yatsenko 2013).

2.2.1 Mužské faktory infertility

Mužskou neplodnost může způsobovat řada faktorů, které ovlivňují tvorbu spermií, například infekce v močových cestách, varikokéla, onkologická onemocnění, nezdravý sedavý životní styl, obezita, úrazy genitálií, konzumace anabolik, alkoholu a jiných návykových látek, některá léčiva a chemické látky, expozice teplu a genetické faktory (Segal a Giudice 2019). Jednou z příčin infertility u mužů jsou numerické chromozomální aberace gonozomů, které často nacházíme u pacientů s abnormálním spermiogramem (u azoospermiků a u oligozoospermiků). Až u 10 % azoospermiků je diagnostikován Klinefelterův syndrom s karyotypem 47,XXY. Časté jsou nálezy strukturních chromozomálních abnormalit; až u 5 % infertilních mužů nalézáme Robertsonské či reciproké translokace, inverze nebo ring chromozomy (Foresta et al. 2005). U části pacientů s azoospermii a těžkou oligozoospermii

odhalí molekulárně genetické vyšetření mikrodelece v AZF oblastech na chromozomu Y. V AZF oblastech se nachází řada genů, které jsou důležité pro vznik a vývoj spermií a mutace v těchto genech mohou ovlivňovat mužskou plodnost. Studium epigenetických faktorů by mohlo rovněž odhalit další příčiny mužské infertility (Zorrilla a Yatsenko 2013).

2.2.2 Ženské faktory infertility

Nejdůležitějším faktorem ženské infertility je bezesporu věk ženy; první známky poklesu plodnosti u žen začínají již mezi 25. a 30. rokem. Dalšími důvody neplodnosti může být předčasná selhání funkce vaječníků (včetně předčasné menopauzy), syndrom polycystických ovárií, endometrióza, případně vrozené vady ženských pohlavních orgánů, děložní polypy a myomy (Vander Borgh t a Wyns 2018; Zegers-Hochschild et al. 2017). Významné jsou rovněž genetické faktory; u neplodných žen se mohou vyskytovat syndromy způsobené abnormálním počtem pohlavních chromozomů, například 47,XXX nebo Turnerův syndrom známý jako 45,X (většinou v mozaice). Mnoho genů je důležitých pro správný průběh meiózy, DNA reparaci v buňkách, nebo pro vývoj folikulů; mutace v těchto genech mohou ovlivňovat plodnost ženy (Zorrilla a Yatsenko 2013).

2.3 Základní embryologické metody v AR

2.3.1 IUI

Mnoha párům, kterým se nedaří otěhotnět a přichází řešit svůj problém do center asistované reprodukce, je jako první varianta léčby navrhována intrauterinní inseminace (IUI). Jedná se o metodu neinvazivní, která je vhodná pro pacienty s lehčími poruchami neplodnosti. Při IUI jsou spermie zavedeny pomocí katetru do horní části dutiny děložní a nemusí tedy překonávat překážky ženského pohlavního ústrojí (Allahbadia 2017). Spermie je třeba před zavedením zkoncentrovat a zpracovat v andrologické laboratoři (Gode et al. 2019).

2.3.2 Ovariální stimulace a punkce

Základní metodou při mimotělním oplodnění je hormonální stimulace ovárií, aby pacientce došlo více oocytů, které jsou následně punktovány (Howie a Kay 2018). Hormony se aplikují injekčně a je důležité, aby jejich dávky byly upraveny na míru konkrétní pacientce. V případě, kdy je pacientce podána vyšší dávka, může dojít k ovariálnímu hyperstimulačnímu syndromu, který může pacientku ohrozit i na životě.

Ovariální punkce je operační zákrok, který je prováděn zpravidla při plné narkóze. Výkon je prováděn pod ultrazvukovou kontrolou intravaginálně pomocí punkční jehly, která prochází skrze poševní stěnu a stěnu vaječníku až do folikulu, z něž je aspirována folikulární tekutina. Pro oocyty je důležitá teplota přirozená tělu matky při ovulaci – přibližně 37 °C – proto je folikulární tekutina při manipulaci neustále zahřívána. Po předání folikulární tekutiny do laboratoře začnou embryologové pod mikroskopem vyhledávat jednotlivé oocyty (Katayama et al. 1988).

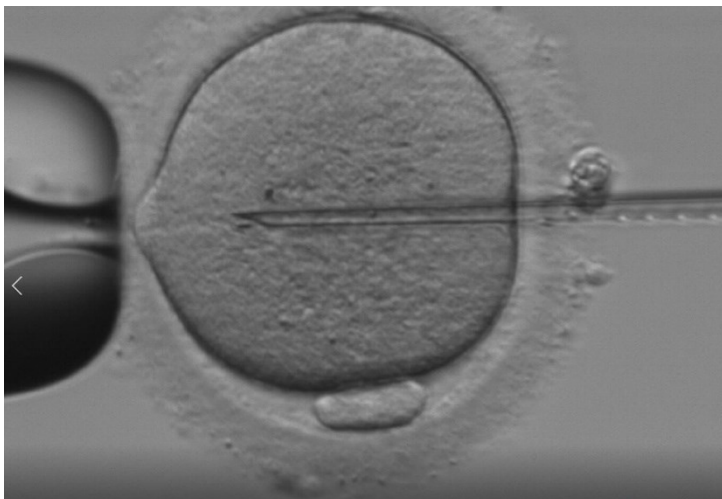
2.3.3 IVF

In vitro fertilizace je jednou z nejstarších metod umělého oplodnění, kdy jsou oocyty po ovariální punkci kultivovány spolu se spermii. K jejich oplození dochází v misce bez zásahu embryologa na základě přirozeného výběru nejrychlejší a nejvitálnější spermie, podobně jako je tomu při běžném oplození v těle ženy. Před přidáním spermií do kultivačního média jsou spermie andrologem zpracovány a až poté přidány do média s oocyty. Tato metoda byla využívána převážně v minulosti, dnes se od ní ve většině případů upouští, jelikož není tolik efektivní, jako metoda ICSI. Spermie nemusí být natolik průbojně, aby překonaly zonu pellucidu a mnohé oocyty zůstanou neoplozeny. (Steptoe a Edwards 1978)

2.3.4 ICSI, PICS

Metoda intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI) je dnes při asistované reprodukci využívána nejčastěji. Do cytoplazmy zralých oocytů je pomocí mikroinjektace vpravena jedna spermie a je jí tedy ulehčen proces překonání zony pellucidy viz Obrázek 1. Nehrozí zde také riziko polyspermie neboli mnohonásobného vniku spermií do oocytu (Laws-King et al. 1987; Palermo et al. 1992; Zheng et al. 2019).

Metoda PICS je v zásadě ICSI, do oocytu je však injektována předvybraná zralá spermie předem kultivovaná v médiu s hyaluronem, který se běžně vyskytuje v extracelulární matrix mezi kumulárními buňkami. Embryolog pak k oplození vybere pouze ty spermie, které byly schopny se na hyaluron navázat. Schopnost spermie navázat se na hyaluron značí její zralost a je zde tedy větší pravděpodobnost, že se jedná o funkčně kvalitní spermii (Huszar, Willetts, a Corrales 1990; Majumdar a Majumdar 2013; Russell a Salustri 2006).



Obrázek 1: Fertilizace oocyty metodou ICSI. Pořízeno v embryologické laboratoři Sanatoria PRONATAL. Autor: L. Jelínková.

2.3.5 MESA, TESE

U pacientů s azoospermií, či jiným patologickým spermioqramem, je často nutné provést operativní zákrok, kterým mohou být spermie získány. Nejběžněji prováděnou metodou je mikrochirurgické odsátí spermií z nadvarlete (MESA), nebo extrakce spermií z varlete (TESE). Oba zákroky jsou prováděny v celkové anestezii. MESA je prováděna přednostně, jelikož prognóza pro oplození takto získanými spermii je lepší. V případě, kdy byl zisk spermií při MESA nedostatečný, provede urolog při téže anestezii také TESE. Odebrané vzorky prohledávají pod mikroskopem embryologové a v případě nálezu spermií vhodných k oplození oocytů se zpracované vzorky zamrazí. Fertilizace takto získanými spermii se provádí výhradně metodou ICSI. (Diemer, Hauptmann, a Weidner 2011; Schlegel 1999; Temple-Smith et al. 1985)

2.3.6 Kontinuální monitorování vývoje embryí

Základní metodou, jak vybrat nejlepší embryo pro transfer, je sledování jeho vývoje v *in vitro* podmínkách v embryologické laboratoři. Embrya jsou hodnocena embryologem buď v delších časových intervalech bez možnosti kontinuálního sledování jejich vývoje, nebo jsou monitorována nepřetržitě pomocí speciálních inkubátorů (time-lapse systémů – TLS) a lze určit přesný čas jejich prvních dělení i další klíčové body související s dělením. Metoda time-lapse je v embryologii používána již od přelomu 20. a 21. století, kdy se metodou časosběrného snímání zkoumaly různé aspekty vývoje embryí, například pohyb a složení cytoplazmatických

fragmentů (Hardarson et al. 2002; Van Blerkom, Davis, a Alexander 2001). Prvotní systémy byly experimentálně sestavovány samotnými výzkumníky a teprve s vývojem komerčně dostupných kultivačních systémů s integrovanými mikroskopy a kamerami bylo možné rozšíření metody time-lapse do embryologických laboratoří v centrech asistované reprodukce.

Time-lapse systémy v pravidelných intervalech pořizují snímky vyvíjejícího se embrya. Embryolog již nemusí embrya kontrolovat mimo inkubátor pod mikroskopem a vystavovat je tak rizikům spojeným s manipulací s nimi. Díky TLS je možné pozorovat také dynamiku dělení buněk (Gallego, Remohí, a Meseguer 2019). Sledování embryí pomocí technologie time-lapse umožňuje vybrat a následně přenést nejlépe se vyvíjející embryo. Při výběru embryí vhodných k transferu se sleduje například symetričnost dělení buněk, jejich fragmentace, morfologie blastomer, polární tělíška, vzhled cytoplazmy, zona pellucida, fragmentace jader (Alegre et al. 2017; Barrie et al. 2017).

Pro monitoring embryí se využívají různé komerční přístroje: Geri® a Geri Plus® (Genea Biomedx), Embryoscope® (Vitrolife), Miri® TL (Esco Medical), Astec CCM-IBIS (Astec), Primo Vision® (Vitrolife), The Eeva™ (Merck Serono) a další (Gallego, Remohí, a Meseguer 2019).

V embryologické laboratoři Sanatoria PRONATAL se k monitoringu embryí používá přístroj Geri®, což je uzavřený kultivační systém snímající embrya v intervalu 5 minut. Obsahuje 6 inkubačních komůrek, do každé je možno umístit až 16 embryí. Tento přístroj zajišťuje stabilní teplotu odpovídající teplotě ženského pohlavního ústrojí (cca 37 °C), zajišťuje také optimální tok plynů (CO₂, O₂) a požadovanou vlhkost. V každé z těchto 6 kultivačních komor je umístěn mikroskop s kamerou s vysokým rozlišením, embrya lze zaostřovat a snímat až v 11 ohniskových rovinách. Pořízené snímky zpracuje speciální software. (URL 1, URL 2)

Vzniklé obrazové záznamy embryolog vyhodnotí a na základě morfokinetických parametrů je schopen určit nejlépe se vyvíjející embrya. Vybraná kvalitní embrya mají vyšší potenciál k úspěšné implantaci. Přenosem nejkvalitnějších embryí se významně zvýší úspěšnost implantace a doba k dosažení těhotenství se zkrátí – sníží se počet neúspěšných transferů jedné pacientky (Harrity et al. 2020).

2.3.7 Embryotransfer

Embryotransfer (ET) je zavedení vyvíjejícího se embrya do dělohy pacientky. Pro embryotransfer mohou být vybrána embrya mezi 2. a 6. dnem od fertilizace (Li et al. 2018). Embryolog nasaje embryo do katetru, předá jej gynekologovi a ten jej přes hrdlo děložní zavede na připravenou děložní sliznici. Transferována mohou být embrya jak čerstvá, tak i zamrazená z předchozích cyklů; při ET i při kryoembryotransferech (KET) je pacientce regulována hladina hormonů, aby bylo endometrium připraveno na implantaci embrya. Embryotransfer je pro většinu pacientek bezbolestný, tenký a pružný katetr je zaváděn pod ultrazvukovou kontrolou (Řezáčová 2018).

2.3.8 Kryokonzervace buněk a tkání v procesu IVF

Kryokonzervace slouží k uchovávání zárodečných buněk a tkání pro jejich budoucí použití. Materiál je uchováván v nádobách s kapalným dusíkem (LN₂), jehož teplota je -196 °C.

Pro mrazení spermií, testikulární, epididymální a ovariální tkáně je nejběžněji používanou metodou takzvané pomalé mrazení za použití speciálního přístroje, který vzorek kontrolovaně a plynule ochlazuje z laboratorní teploty na teplotu hluboko pod bodem mrazu. Materiál je před mrazením zpracován, je k němu přidáno kryokonzervační médium s kryoprotektivy a je hermeticky uzavřen do pejet, či do ampulí. Mrazení i uchovávání andrologického materiálu je technologicky méně náročné, spermie totiž nemusí být nutně zcela ponořeny do LN₂, vydrží i v jeho parách (-167 °C) (Hu et al. 2015; Trávník 2018).

Hlavička spermie obsahuje velmi malé množství cytoplazmy oproti oocytům či embryím. Postupným mrazením kapalné složky buněk vznikají krystalky, které mohou buňku nevratně poničit – pro spermie je však metoda pomalého mrazení bezpečná.

K zamrazování oocytů a embryí se používá metoda jiná – vitrifikace. Jedná se o rychlý způsob mrazení, kdy je embryo či oocyt postupně proplachován v několika vysoce koncentrovaných kryokonzervačních médiích a díky nim a rychlému ponoření do kapalného dusíku se v oocytu či embryu nestihnou vytvořit krystalky a ihned přejdou do skelné formy (Kratochvílová et al. 2017). Prvně vitrifikaci na lidských embryích popsal Mukaida a spol. (1998). Existují dvě metody vitrifikace – otevřený a uzavřený systém. Při vitrifikaci v otevřeném systému přichází materiál do přímého kontaktu s tekutým dusíkem, zatímco v uzavřeném systému je materiál

hermeticky uzavřen v pejetách. Příímý styk s kapalným dusíkem je považován za rizikový, jelikož teoreticky hrozí riziko přenosu infekčních agens na ostatní vzorky. Byla provedena řada studií na toto téma, výsledky však stále nejsou jednoznačné (Vajta, Rienzi, a Ubaldi 2015).

2.3.9 Biopsie

Pokud je indikováno preimplantační genetické testování (PGT-A), je nutné z embrya ještě před embryotransferem odebrat pár buněk. Dříve se biopsie dělala třetí den vývoje embrya, byla z něj odebrána pouze jedna či dvě blastomery a embryo mohlo být transferováno ještě v témže cyklu. V současné době se pro PGT používají buňky trofektodermu (Zacchini et al. 2017). Obvykle embryolog odebírá 5-10 buněk 5.-6. den po oplození embrya. Odběr většího množství materiálu přináší vyšší spolehlivost výsledků PGT. Bezprostředně po biopsii je blastocysta vitrifikována. Odebrané buňky trofektodermu jsou vyšetřeny v genetické laboratoři a embrya doporučená k transferu jsou přenesena ženě v některém z jejích následujících přirozených cyklů. Tento postup se začal používat častěji poté, co se zdokonalily vitrifikační protokoly zajišťující vyšší úspěšnost přežití vitrifikovaných blastocyst (AU - Maggiulli et al. 2019).

Biopsie buněk z lidských preimplantačních embryí byla prováděna již na začátku 90. let dvacátého století, kdy Hardy a spol. (1990) potvrdil, že odebrání jedné či dvou blastomer z třídenních embryí nemá vliv na jejich následující vývoj a schopnost implantace.

3 Raný vývoj preimplantačních embryí

3.1 Oplození

Před ovulací se oocyt nachází v profázi prvního meiotického dělení, ve které setrvává již od prenatálního vývoje ženy. V době ovulace své první meiotické dělení dokončí, zastaví se v metafázi druhého meiotického dělení a oddělí se první pólóvé tělísko (PB). Po oplození oocytu spermií se dokončí druhé meiotické dělení a oddělí se druhé PB. Nyní se v oplozeném oocytu (zygotě) nachází dvě prvojádra (pronuclei), každé z nich obsahuje chromozomy pocházející z oocytu a ze spermie obklopené jadernou membránou. Pronuclei se k sobě postupně přibližují a než spolu splynou, jsou určitý čas v kontaktu přitisknuta jedno na druhé (Payne et al. 1997).

3.2 Fáze rýhování časného embrya

Před prvním mitotickým dělením prvojádra splývají. Následně se zygota rozdělí do dvou blastomer, v nichž se vytvoří ohraničená jádra s diploidním genomem budoucího plodu. Při ideálním dělení blastomer vždy z jedné buňky vzniknou dvě nové, embryo se dělí exponenciálně. Oocyt se první tři dny po ovulaci nachází v období takzvaného transkripčního klidu, jelikož v něm byly již v době oogeneze nasyntetizovány potřebné enzymy a ribonukleové kyseliny. V těchto třech dnech je oocyt oplozen, aktivován, stává se z něj zygota, která je epigeneticky reprogramována, proběhne první mitotické dělení do dvou blastomer, ty jsou v dalším mitotickém dělení rozděleny do čtyř buněk a mezi čtyř- až osmibuněčným stádiem se již aktivuje embryonální genom. Před aktivací transkripce se maternální proteiny i RNA musí degradovat, aby se mohlo embryo dále normálně vyvíjet (Braude, Bolton, a Moore 1988).

Zygotu ohraničuje zona pellucida, která drží tvar embrya až do fáze blastocysty. Z toho je tedy zřejmé, že každým dělením se blastomery zmenšují. Dělení buněk v rýhujícím se embryu nemusí být vždy dokonale synchronní.

3.3 Fáze kompaktace

Ve fázi kompaktace embrya již nejsme schopni od sebe rozeznat jednotlivé buňky. Přes fázi kompaktní moruly, jež je zcela vyplněna buňkami, se embryo dostává do fáze blastocysty.

3.4 Fáze blastocysty

Blastocysta se vyznačuje dutinkou – blastocelem; buňky se diferencují na embryoblast (inner cell mass (ICM)– základ budoucího plodu) a trofoblast (trofektoderm (TE)– základ budoucí placenty). Buňky trofektodermu jsou lokalizovány po obvodu blastocysty. Během pátého nebo šestého dne vývoje embrya se blastocysta začíná klubat přes zonu pellucidu ven. Tomuto procesu se říká hatching a v *in vitro* podmínkách se velmi často provádí asistovaný hatching pomocí laseru či manuálně (Trávník 2018).

3.5 Hodnocení embryí

Hodnocení embryí je nedílnou součástí jejich výběru k embryotransferu. Embrya je nutné sledovat v určitých vývojových stádiích a na základě pozorování morfologických znaků lze predikovat jejich schopnost úspěšné implantace. Vzhledem k neustálému zvyšování počtu klinik asistované reprodukce a embryologů bylo nutné sjednotit systém hodnocení embryí.

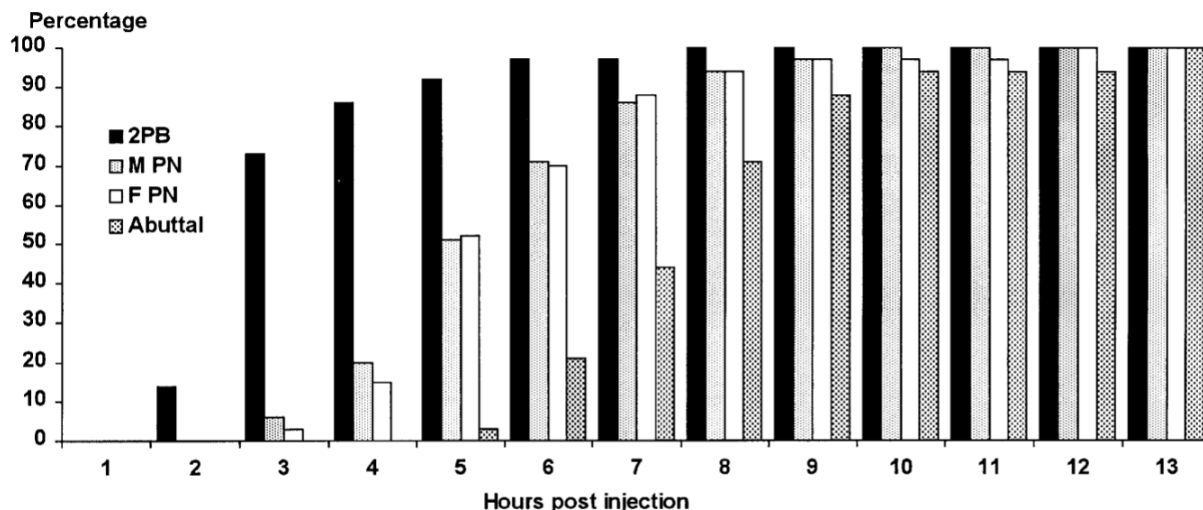
Přední odborníci na embryologii z odborné společnosti ESHRE se na workshopu v Istanbulu (2011) shodli na konsenzu o jednotném a všeobecně uznávaném skórovacím hodnocení embryí, které se uplatňuje dodnes, ale není závazné a některé laboratoře si vytvořily vlastní upravený skórovací systém.

Den 0:

Po punkci ovárií jsou odebrané oocyty sledovány na přítomnost pólového tělíska, někdy totiž nemusí dojít k jeho vypuzení. Následkem toho má oocyt diploidní chromozomální výbavu a je oproti haploidnímu oocytu značně větší.

Den 1:

Po přibližně 16-18 hodinách od oplození se u oocytů pozoruje, zda jsou uvnitř přítomna 2 prvojádra a zda bylo z oplozeného oocytu vypuzeno i druhé pólové tělísco. Vzhledem k rychlé kinetice se však první PB může již rozpadnout, či prvojádra splýnout, obecně však platí, že u embryí, u nichž proběhne rozdělení do dvou buněk <20 hodin od fertilizace, je zvýšené riziko aneuploidií. Hledí se také na uspořádání jadérek, jejich velikost a symetrii. V Grafu 1 jsou znázorněny děje odehrávající se v prvních 13 hodinách po oplození.



Graf 1: Procentuální zastoupení výskytu charakteristických faktorů ve sledovaném vzorku embryí v průběhu 13 hodin po fertilizaci metodou ICSI. Převzato z (Payne et al. 1997).

2PB – vyloučené druhé pólové tělísco, M PN – prvojádro paternálního původu, F PN – prvojádro maternálního původu, Abuttal – kontakt prvojader

Den 2 a 3:

U embryí v dvoudenním a třídenním stádiu je hodnocena míra fragmentace embrya, kde bylo prokázáno, že mírná fragmentace <10-20 % by neměla mít vliv na životaschopnost embrya.

Hodnotí se také, zda se u embrya objevila fragmentace jader, jež je spojována s nižší úspěšností implantace embrya. Dalším sledovaným parametrem je symetrie dělení spojovaná s pravděpodobností chromozomálních aberací či nerovnoměrnou distribucí mRNA, proteinů a mitochondrií. V neposlední řadě je sledováno také abnormální dělení, kdy se buňka nerozdělí ve dvě, nýbrž ve více buněk.

Na základě časů dělení jsou embrya rozdělena do 4 skupin:

- Embrya se zastaveným vývojem – v průběhu 24 hodin se nedělila
- „Pomalá“ embrya – v den 3 (68 hodin po fertilizaci) mají 6 a méně buněk
- „Normální“ embrya – v den 3 mají 7-9 buněk (dělila se v posledních 24 hodinách, fragmentace <15 %, bez multinukleace)
- „Zrychlená“ embrya – v den 3 mají více než 9 buněk

Den 4:

Čtvrtý den vývoje se hodnotí stupeň kompaktace moruly (The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. 2011).

Den 5 a 6:

5. den po oplození se embryo nachází ve stádiu blastocysty, u některých embryí je vývoj opožděn a do tohoto stádia se dostává až 6. den. Gardner a Schoolcraft (1999) navrhli hodnotící systém blastocyst, který převzala většina světových laboratoří. Hodnocena jsou 3 kritéria:

1. stupeň expanze (viz Obrázek 2)

- B1 – blastocoel <polovina objemu embrya
- B2 – blastocoel >polovina objemu embrya
- B3 – plná blastocysta, blastocoel v celém rozsahu embrya, jasně diferenciovaná ICM a TE
- B4 – expandovaná blastocysta, průměr blastocysty zvětšen proti původnímu embryu, zona pellucida ztenčena
- B5 – hatchující blastocysta (blastocysta opouštějící zonu pellucidu)
- B6 – blastocysta kompletně opustila zonu pellucidu

2. kvalita ICM (embryblastu)

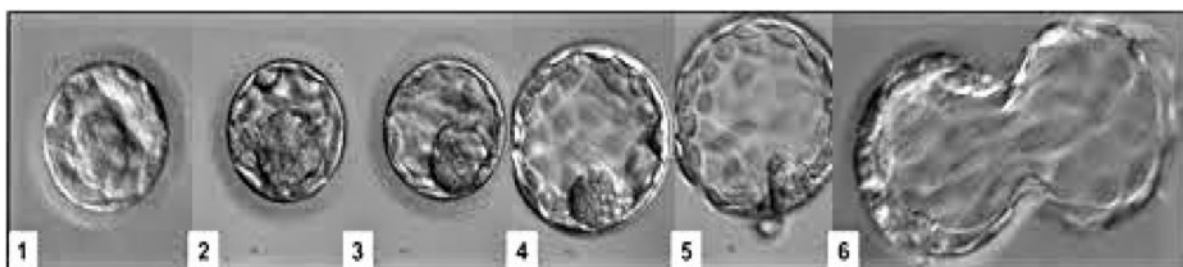
- A – kompaktní ICM, velké množství menších buněk

- B – méně buněk, buňky větší, méně kompaktní
- C – velmi málo buněk

3. kvalita TE (trofektodermu)

- A – mnoho plochých buněk, >10 buněk na průřezu blastocystou
- B – méně buněk, přítomny degenerované buňky, <10 buněk na průřezu blastocystou
- C – velmi málo buněk, buňky velké kulaté, degenerované buňky

V laboratoři Sanatoria PRONATAL se využívá pro hodnocení embryí tento systém podle standardního operačního postupu 4-SOP-Pmg-08.



Obrázek 2: Hodnocení stupně expanze blastocysty. Převzato z URL 3.

1 – blastocoel <polovina objemu embrya, 2 – blastocoel >polovina objemu embrya, 3 – plná blastocysta, 4 – expandovaná blastocysta, 5 – hatchující blastocysta, 6 – blastocysta kompletně opustila zonu pellucidu

4 Chromozomální abnormality v preimplantačních embryích

Euploidní (chromozomálně normální) lidská somatická buňka obsahuje 22 párů autozomů a 2 pohlavní chromozomy (gonozomy): XX u žen a XY u mužů. Mužské i ženské pohlavní buňky jsou haploidní (s poloviční sadou chromozomů) a teprve oplozením oocytu spermií vzniká diploidní sada chromozomů. Zdravý jedinec se vyvine pouze z euploidního embrya. Značná část embryí není euploidní, některé chromozomy nebo jejich části chybí, nebo naopak nadbývají. Takováto embrya se označují jako aneuploidní, případně nebalancovaná a jsou častou příčinou neúspěšné implantace a spontánních abortů jak v IVF cyklech, tak i v přirozeně vzniklých těhotenstvích. Prenatální screening odhalí přibližně 4 % aneuploidních plodů a u okolo 0,3 % novorozenců je diagnostikována aneuploidie, nejčastěji Downův syndrom (Hassold a Hunt 2001; Menasha et al. 2005).

Aneuploidie jsou důsledkem chyb ve složitých procesech, kterými buňka prochází v meióze nebo v prvních mitotických děleních raného vývoje embrya. Některá embrya s numerickou chromozomální abnormalitou však přežívají a může se z nich narodit postižené dítě: Downův syndrom (3x21), Patauův syndrom (3x13), Edwardsův syndrom (3x18), Klinefelterův syndrom (47,XXY), Turnerův syndrom (45,X).

Strukturními abnormalitami se rozumí přestavby vzniklé následkem chromozomálních zlomů a jejich následným spojením v jiném místě. Mohou vznikat spontánně nebo je mohou vyvolat některé vnější faktory, například záření, chemické látky, viry. U balancovaných přestaveb je zachováno správné množství genetického materiálu, u nebalancovaných přestaveb genetický materiál nadbývá nebo chybí, což se projevuje určitými fenotypovými znaky u narozených dětí (Nussbaum, McInnes, a Willard 2004).

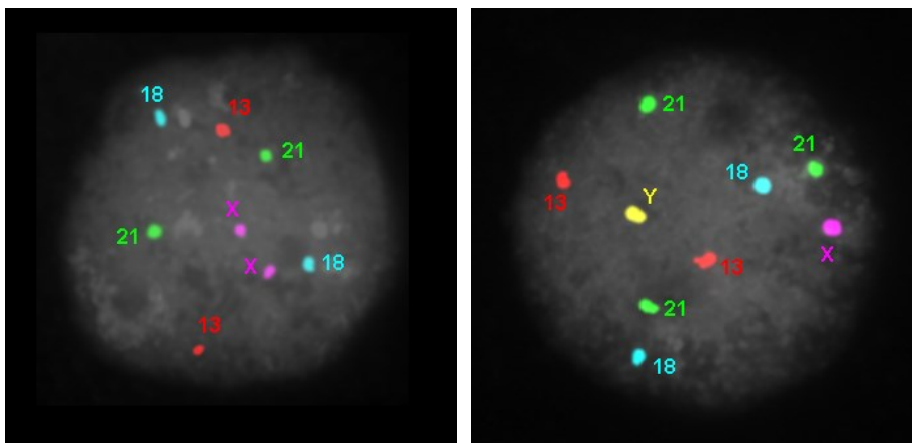
5 Preimplantační genetické testování embryí (PGT)

Již od konce 60. let 20. století je známo, že nadpoloviční většina spontánně potracených plodů je karyotypově abnormálních (Boué, A, a Lazar 1975; Bowen a Lee 1969; Hassold et al. 1980). Worton (1977) potvrdil, že aneuploidie jsou hlavní příčinou neúspěšné implantace embrya do dělohy pacientky. Na počátku 90. let 20. století se začala preimplantační embrya vyšetřovat na přítomnost aneuploidií (Gianaroli et al. 1997; S. Munné et al. 1993; Verlinsky et al. 1995). První genetické vyšetření lidských preimplantačních embryí prováděl Handyside a spol. (1989) již koncem 80. let 20. století. U blastomer odebraných z třídenních embryí určil pohlaví metodou PCR; tento přístup byl vhodný pro pacienty s X-vázanými chorobami.

Preimplantační genetické testování embryí (PGT) je velmi časná forma prenatalní diagnostiky, která umožňuje vyšetřit preimplantační embrya a vybrat z nich ta, která jsou vhodná k přenesení do dělohy. Provádí se z různých důvodů a indikovat by je měl vždy klinický genetik. Existuje řada indikací k PGT: vyšší věk ženy, protože s vyšším věkem stoupá počet geneticky abnormálních vajíček a tím riziko potratu a narození dítěte s genetickou vadou, gonozomální mozaiky, opakované spontánní aborty, opakovaně neúspěšná implantace po IVF, těžké poruchy spermiogramu, použití spermií po MESA nebo TESE, určení pohlaví u chorob vázaných na pohlaví, kde není možná přímá diagnostika, volba pohlaví při prokázané mikrodeleci na

chromozomu Y, chromozomální aberace u jednoho z partnerů, chromozomální aberace plodu nebo dítěte v předchozí graviditě, preimplantační diagnostika u monogenních chorob. Současná terminologie rozlišující přesně účel vyšetření embryí: preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A), strukturních chromozomálních přestaveb (PGT-SR) a monogenních chorob (PGT-M). (URL 4)

Pro PGT-A se dlouhá léta používala metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) na interfázních jádrech. Tato metoda umožňuje rychlé vyšetření omezeného počtu chromozomů. Principem je hybridizace fluorescenčně značené sondy ke specifickému úseku na chromozomu. Z třídních embryí jsou embryologem za pomoci mikromanipulátoru odebrány 1-2 blastomery, které jsou fixovány na podložní sklíčko, hybridizovány se sondou a po odmytí nespecificky navázané sondy jsou preparáty hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu viz Obrázek 3. Běžným standardem bylo vyšetřování 8 vybraných chromozomů: 13, 18, 21, X, Y (aneuploidie těchto chromozomů umožňují narození postiženého dítěte), 15, 16, 22 (aneuploidie těchto chromozomů jsou často nalézány v abortech a embryích starších párů). Vyšetření těchto 8 chromozomů dokázalo odhalit asi 80 % abnormalit vyskytujících se v preimplantačních embryích (S. Munné et al. 1998; Scriven, Kirby, a Ogilvie 2011).

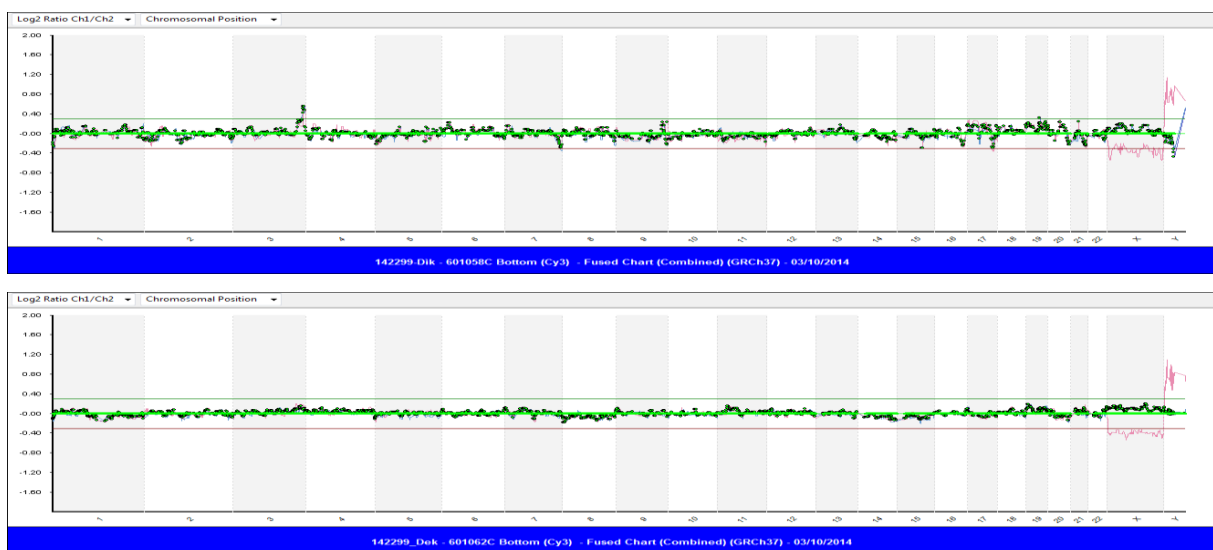


Obrázek 3: FISH na interfázním jádru blastomery z třídního embrya s normálním počtem chromozomů 13, 18, 21 a X (vlevo) a blastomery s trizomií chromozomu 21 a s normálním počtem chromozomů 13, 18, X a Y (vpravo). Hodnoceno a snímáno na fluorescenčním mikroskopu Nikon 90i, upraveno obrazovou analýzou Lucia, LIM, v Genetické laboratoři Sanatoria PRONATAL. Autor: K Slabá.

PGT-A metodou FISH umožňovalo provést čerstvý transfer vyšetřených embryí v témže cyklu. Nevýhodou metody FISH je omezený počet vyšetřovaných chromozomů, možnost prostorového překryvu fluorescenčních signálů, subjektivita při hodnocení. Rovněž vzhledem

k výskytu mozaicismu u preimplantačních embryí nebylo vyšetření pouze jedné blastomery plně reprezentativní (S. Munné et al. 1994).

Od roku 2008 byla metoda FISH postupně nahrazována metodou array CGH, která umožňovala vyšetření všech 24 chromozomů z jedné nebo více buněk. Tato metoda je založena na hybridizaci vyšetřované a referenční DNA k BAC sondám navázaným na DNA čipu. Každý BAC pochází ze specifického chromozomálního úseku. Hybridizaci předchází celogenomová amplifikace DNA z vyšetřovaného materiálu. Výsledky vyhodnocuje speciální software viz Obrázek 4.

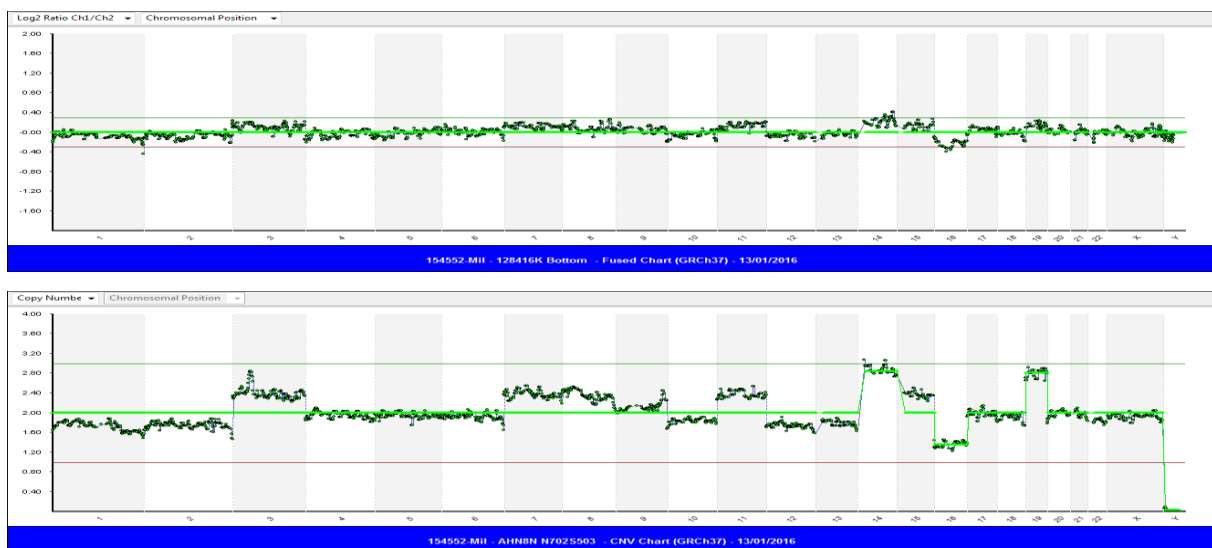


Obrázek 4: Porovnání grafických výstupů analýzy jedné blastomery z třídního embrya vyšetřené metodou aCGH (nahore) a buněk trofektodermu stejného pětidenního embrya vyšetřených stejnou metodou (dole). Vzorky byly vyšetřeny kitem 24sure, BlueGnome. Použitý software BlueFuse, BlueGnome/Illumina. Je zřetelné zlepšení kvality výstupu při vyšetření více buněk trofektodermu oproti jedné blastomeře. Výsledky byly získány v Genetické laboratoři Sanatoria PRONATAL. Autor: M. Kosařová.

Pokud se metodou aCGH vyšetřovaly blastomery třídních embryí, byl možný čerstvý transfer blastocyst v témže cyklu. Pokud se vyšetřovaly buňky trofektodermu, byla embrya po biopsii vitrifikována a vyšetřená doporučená embrya byla přenesena v některém z dalších cyklů ženy. Vyšetření buněk trofektodermu má oproti vyšetření blastomery řadu výhod: snižuje se počet vyšetřovaných embryí, jelikož se vyšetřují pouze embrya, která se vyvinula do stádia blastocysty, výsledky testování více buněk jsou lépe hodnotitelné a eliminují se rizika vyplývající z mozaicismu blastomer. Podle rozlišovací schopnosti mohly být aCGH čipy použity na detekci aneuploidií celých chromozomů, na rozlišení balancovaných a nebalancovaných

embryí u nosičů Robertsonských i reciprokových translokací a inverzí. Metodou aCGH nelze detekovat polyploidie, segmentální abnormality pod rozlišovací schopností metody, mozaiky menší než 50 %, nelze rozlišit balancovaná embrya od embryí s normálním uspořádáním chromozomů, ani změny v DNA sekvenci. (Fiegler et al. 2007; Le Caignec et al. 2006).

Metoda NGS, která nahradila aCGH, je založena na celogenomové amplifikaci DNA z odebraných buněk trofektodermu a sekvenování nové generace (NGS) (Tan et al. 2014). Z amplifikované DNA je připravena DNA knihovna, která je osekvenována metodou NGS a speciální software vyhodnotí počty čtení jednotlivých chromozomálních úseků. Výsledkem je graf, ve kterém jsou znázorněny počty kopií DNA úseků viz Obrázek 5.



Obrázek 5: Porovnání grafických výstupů analýzy buněk trofektodermu vyšetřených metodou aCGH kitem 24sure, BlueGnome (nahore) a totožného vzorku vyšetřeného metodou NGS kitem VeriSeq na sekvenátoru MiSeq, Illumina (dole). Použitý software BlueFuse, BlueGnome/Illumina. Je zřetelná větší rozlišovací schopnost metody NGS oproti metodě aCGH. Ve vzorku byla metodou NGS detekována komplexní mozaika několika chromozomů, jejíž detekce je pod rozlišovací schopností metody aCGH. Výsledky byly získány v Genetické laboratoři Sanatoria PRONATAL. Autor: M. Kosařová.

Díky citlivosti metody NGS se objevil nový fenomén – mozaicismus v buňkách trofektodermu a embryí. U značného procenta embryí je detekována větší či menší mozaika aneuploidie jednoho nebo více chromozomů. Problém představují také segmentální abnormality, které byly pod detekčním limitem metody array CGH, ale metoda NGS je schopna je detekovat. Interpretace výsledků embryí s mozaikou nebo se segmentálními abnormalitami v mozaice se provádí podle doporučení mezinárodní odborné společnosti PGDIS z roku 2019 (URL 5), která doporučila rozdělení embryí do kategorií s nízkým, středním a vysokým rizikem aneuploidie a

navrhla management hodnocení jejich vhodnosti pro transfer. Podle nejnovějších studií se ukazuje, že u přibližně 50% embryí s pozorovanou mozaikou segmentální abnormality ve vyšetřovaném vzorku trofektodermu a u necelých 70% embryí s pozorovanou mozaikou celých chromozomů ve vyšetřovaném vzorku trofektodermu se tyto abnormality nevyskytují v ostatních buňkách embrya (Navratil et al. 2020). Embrya se středním rizikem lze proto doporučit k podmíněnému transferu po konzultaci s klinickým genetikem, který páru vysvětlí případná rizika. Embrya s vysokým rizikem se k transferu nedoporučují (Capalbo et al. 2017).

Aneuploidie a strukturní přestavby dokáže vyšetřit i metoda karyomapping založená na hybridizaci vyšetřované namnožené DNA na SNP čipech. Karyomapping byl původně určen na nepřímou genetickou diagnostiku monogenních chorob haplotypizací (PGT-M), ale je schopen v jedné reakci vyšetřit počet chromozomů (PGT-A), rozlišit nebalancovaná a balancovaná embrya u nosičů balancovaných translokací (PGT-SR) a určit maternální či paternální původ chromozomů u embryí (Alan H. Handyside 2011, 2015).

6 Korelace vývoje preimplantačních embryí s jejich chromozomální výbavou

Ještě před zavedením kontinuálního monitoringu vývoje embryí do běžného provozu laboratoří se mnoho embryologů zabývalo otázkou souvislosti kvality vývoje embryí s jejich ploidii. V dnešní době je již řada embryologických laboratoří těmito monitorovacími zařízeními vybavena, ale stále se jedná o nadstandardní metodu, a ne všechna embrya jsou hodnocena za pomoci tohoto systému. Standardní hodnocení provádí embryolog v daných časech, embrya nejsou sledována po celou dobu jejich vývoje a kinetika dělení tedy není zaznamenána. (Alfarawati et al. 2011; Capalbo et al. 2014; Santiago Munné et al. 2019)

Time-lapse umožňuje sledovat řadu parametrů: čas vymizení prvojader, časy jednotlivých mitotických dělení, jejich synchronicitu, stupeň fragmentace blastomer, délku buněčných cyklů, fragmentaci jader, čas nástupu kompaktace a blastulace, dobu nástupu hatchingu a další.

Byla také provedena řada studií, které se nezaměřovaly na korelaci mezi výstupy z time-lapse a ploidii, ale sledovaly úspěšnost implantace a následného otěhotnění po přenosu embryí

hodnocených na základě výsledků TLS (Adolfsson, Porath, a Andershed 2018; Hlinka et al. 2012; Meseguer et al. 2011; Reignier et al. 2019; Rubio et al. 2012).

Jednu z prvních studií zabývajících se korelací ploidie a morfokinetických vlastností provedla Campbell a spol. (2013a), která sledovala mimo jiné délku prvního a druhého buněčného cyklu, synchronicitu 2. a 3. mitotického dělení; u těchto faktorů nebyl prokázán vztah k ploidii embrya. Sledováním času nástupu blastulace zjistila, že u aneuploidních embryí dochází k jejímu pozdějšímu nástupu v porovnání s embryi euploidními a sestavila algoritmus pro predikci ploidie embryí; embrya byla rozřazena do 3 skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem aneuploidie. Jedním ze sledovaných parametrů byl také výskyt fragmentovaných jader, tzv. multinukleace. Jedná se o stav, kdy blastomera neobsahuje jedno celistvé jádro, ale jaderný materiál je rozdělen do více kompaktních fragmentů. Porovnáním výsledků PGT-A na blastomerách i buňkách trofektodermu bylo zjištěno, že multinukleace v prvních buněčných děleních nemá na ploidii embryí výraznější vliv (Balakier et al. 2016; Campbell et al. 2013a). Vytvořený model pro výpočet rizika aneuploidií aplikovala Campbell a spol. (2013b) v retrospektivní studii provedené u 88 blastocyst a potvrdila, že by tento model mohl být vhodný pro výběr životaschopného embrya bez použití invazivního PGT-A. Stejný způsob hodnocení morfokinetických parametrů a rozřazení embryí do 3 skupin podle rizika aneuploidie byl aplikován ve studii na 235 embryích, u nichž bylo provedeno PGT-A na buňkách trofektodermu (Kramer et al. 2014). Autoři této studie však vhodnost použití modelu Campbell a spol. (2013a) pro neinvazivní hodnocení rizikovosti embrya a odhad aneuploidií nepotvrdili.

Další algoritmus pro odhad euploidních embryí sestavil Basile a spol. (2014), který sledoval několik morfokinetických znaků u 504 embryí a zaměřil se na porovnání časů mezi 1. a začátkem 3. mitotického dělení a trváním 3. buněčného cyklu. Embrya byla podle těchto 2 parametrů rozřazena do 4 skupin, u nichž bylo zkoumáno procento aneuploidních embryí. Vyšetření aneuploidií bylo provedeno metodou array CGH na blastomerách odebraných z třídenních embryí. Nejvíce euploidních embryí bylo ve skupině s časem mezi 1. a začátkem 3. mitotického dělení >20,5 hodin a trváním 3. buněčného cyklu v intervalu 11-18 hodin. Na základě výsledků studie byl vytvořen algoritmus pro výběr vhodných embryí k přenosu nezávisle na dni transferu, jelikož z výsledků vyplýval vysoký stupeň korelace mezi morfokinetickými parametry a ploidií embryí. Přesto bylo doporučeno preimplantační

vyšetření aneuploidií provádět a embrya hodnotit na základě obou přístupů. Ke stejnému závěru dospěla také Chawla a spol. (2015), která studovala stejné parametry vývoje u 460 embryí a PGT-A v této studii bylo prováděno rovněž na blastomerách z třídenních embryí metodou aCGH.

Odlišný závěr vyplývá z práce Rienzi a spol. (2015), která vyšetřovala bioptované buňky trofektodermu na přítomnost aneuploidií u 455 blastocyst. S použitím stejného algoritmu jako Basile a spol. (2014) však nezjistila korelaci mezi ploidií a morfokinetickými znaky sledovaných embryí. Z výsledků této analýzy vyplývalo, že spolu morfokinetické parametry preimplantačních embryí a jejich chromozomální výbava nekorelují; bylo však potvrzeno, že míra pravděpodobnosti aneuploidie stoupá s věkem pacientky.

Minasi a spol. (2016) porovnávali morfologické, morfokinetické a genetické vlastnosti u 1730 embryí. PGT-A bylo provedeno na buňkách trofektodermu metodou array CGH. Morfokinetické parametry jsou podle autorů studie pro výběr embrya validnější než statické hodnocení morfologie embryí, avšak korelace mezi morfokinetickými parametry a ploidií embryí nebyla významná. Ke stejnému závěru došli také autoři Yang a spol. (2014), kteří na základě studie s 1163 oocyty MII prokázali, že morfokinetické vlastnosti aneuploidních a euploidních embryí se výrazně neliší.

Jedna ze studií se zabývala korelací mezi typem aneuploidie a morfokinetickými parametry. Nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl v morfokinetickém vývoji normálních a trizomických embryí, embrya s komplexními abnormalitami (dvě a více aneuploidie) však vykazovala kratší časy dělení buněk (Del Carmen Nogales et al. 2017).

Kimelman a spol. (2019) se zabývali zjišťováním morfokinetických parametrů pro možnost určení euploidních embryí a porovnávala mezi sebou také blastocysty 5. a 6. dne. Embrya byla opět rozdělena na ta, která podstoupila PGT-A a na ta, která byla vybrána pouze na základě jejich morfokinetických parametrů a byla u nich sledována míra úspěšnosti implantace. Z výsledků vyplývá, že u preimplantačně geneticky testovaných embryí spíše nezáleželo na tom, zda se jednalo o blastocystu pěti- či šestidenní, míra úspěšnosti jejich implantace byla v porovnání s netestovanými embryi značně vyšší. U embryí, která však nebyla testována PGT-A bylo zjištěno, že morfokineticky lépe vyvíjená pětidenní embrya mají větší šanci na úspěšnou

implantaci než embrya šestidenní. Ve studii se také zjistilo, že míra úspěšnosti otěhotnění koreluje s časem rýhování embrya do 7 a 8 buněk.

Gazzo a spol. (2020) použili pro hodnocení 912 embryí prediktivní algoritmus KidScore™ D5, embrya byla hodnocena od 1 do 6, přičemž čím vyšší hodnota, tím lepší morfokinetické parametry. Studie se zaměřovala také na úspěšnost implantace embryí a dosaženého klinického těhotenství. Z dat vyplývá, že hodnocení embryí pouze na základě KidScore™ není dostačující, přestože u embryí s nejlepším skóre 6 byla významná pravděpodobnost jejich euploidie. U embryí po PGT je však posuzování jejich vývoje na základě tohoto algoritmu výhodné.

Z žádné ze zpracovaných studií nevyplývá jednoznačná korelace mezi sledovanými morfokinetickými parametry a ploidií embrya. V závěru většiny studií je doporučení provést širší multicentrickou studii na větším vzorku embryí.

7 Korelace výstupu z time-lapse s výsledky PGT-A ve sledovaném souboru 177 embryí

V rámci bakalářské práce jsem porovnávala výsledky pozorování vývoje embryí v time-lapse systému Geri® s jejich genetickými nálezy po PGT-A vyšetření. Pracovala jsem se souborem 177 embryí od 42 pacientek, které podstoupily punkci v určitém období mezi roky 2019 a 2020. Embrya byla kultivována v time-lapse zařízení od oplození po celou dobu jejich vývoje do biopsie. TLS Geri® používaný v laboratoři Sanatoria PRONATAL umožňuje sledovat embrya v časovém intervalu 5 minut a až v 11 zaostřovacích rovinách. U těchto 177 embryí jsem retrospektivně sledovala: čas prvního mitotického dělení (od fertilizace)(T2), symetricitu blastomer dvoubuněčného embrya, stupeň fragmentace dvoubuněčného embrya (FR2), přítomnost fragmentace jader dvoubuněčného embrya (Obrázek 6), posouzení normality/abnormality prvního mitotického dělení (na základě počtu buněk, rolování cytoplazmy, odškrcení a fúze buněk a vysokého stupně fragmentace), čas druhého mitotického dělení (od fertilizace) do vzniku třibuněčného (T3) a čtyřbuněčného (T4) stádia, synchronnost druhého mitotického dělení (S3-4), stupeň fragmentace čtyřbuněčného embrya (FR4) a posouzení normality/abnormality druhého mitotického dělení. Stupeň fragmentace

byl posuzován dle zavedeného manuálu embryologické laboratoře Sanatoria PRONATAL; hodnotu 1 mají embrya s mírou fragmentace <15 %, hodnotu 2 je přidělena embryím s mírou fragmentace 15-30 %, hodnotu 3 mají embrya s 30-50% mírou fragmentace a embryí s 50% a vyšší fragmentací mají hodnotu 4.



Obrázek 6: Dvoubuněčné embryo s multinukleací v jedné blastomeře (vlevo) zobrazené v systému Geri®. Pořízeno v embryologické laboratoři Sanatoria PRONATAL. Autor: Z. Kosařová.

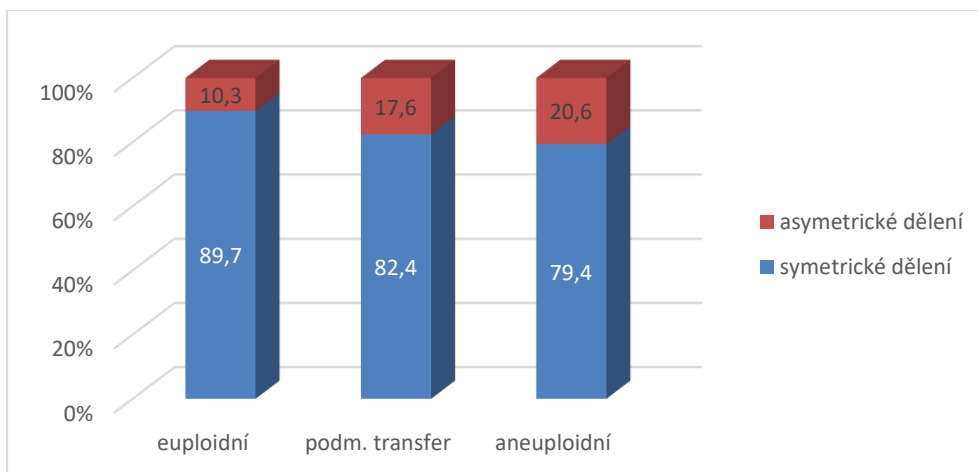
Hodnocený soubor obsahuje pouze embrya, která se vyvinula do stádia blastocysty a splňovala podmínky pro biopsii. 5. nebo 6. den po oplození z nich byly odebrány buňky trofektodermu, u kterých bylo provedeno PGT-A metodou NGS. Průměrný věk pacientek byl 36,3 let a jejich indikace k PGT-A byly z důvodu věku matky, opakovaných selhání implantace a opakovaných abortů. Pomocí preimplantačního genetického testování bylo zjištěno, že 58 embryí (32,8 %) bylo euploidních, 17 embryí (9,6 %) bylo pravděpodobně euploidních s podmíněným doporučením k transferu a 102 embryí (57,6 %) bylo aneuploidních. Výsledky pozorování jsou shrnuty v Tabulce 1, kde jsou uvedeny střední hodnoty naměřených časů a průměrné hodnoty ostatních sledovaných parametrů.

	Euploidní	Podmíněně transfer.	Aneuploidní
T2	24,63 hodiny	25,5 hodiny	24,5 hodiny
Asymetrie blastomer	10,3 %	17,6 %	20,6 %
Fragmentace jader	50 %	70,6 %	63,7 %
FR2	1,19	1,41	1,28
1. abnormální dělení	6,9 %	17,6 %	15,7 %
T3	36,63 hodiny	36,83 hodiny	35,5 hodiny
T4	36,83 hodiny	37,33 hodiny	36,42 hodiny
S3-4	25 minut	40 minut	30 minut
2. abnormální dělení	24,1 %	17,4 %	16,7 %
FR4	1,34	1,47	1,41

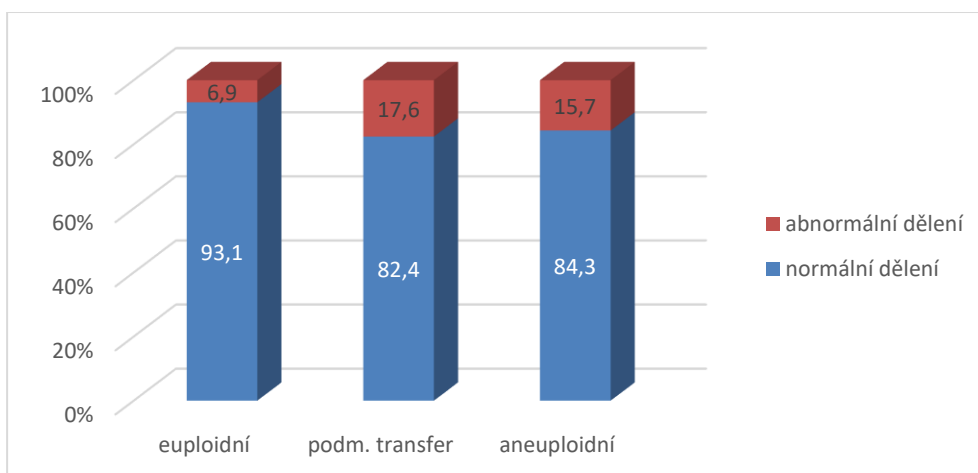
Tabulka 1: Výstup time-lapse hodnocení embryí rozdělených na základě výsledků PGT-A.

T2: čas od fertilizace do prvního mitotického dělení, FR2: stupeň fragmentace dvoubuněčného embrya, T3: čas od fertilizace po vznik třibuněčného embrya, T4: čas od fertilizace po vznik čtyřbuněčného embrya, S3-4: synchronnost druhého mitotického dělení (časový rozestup mezi T3 a T4), FR4: stupeň fragmentace čtyřbuněčného embrya

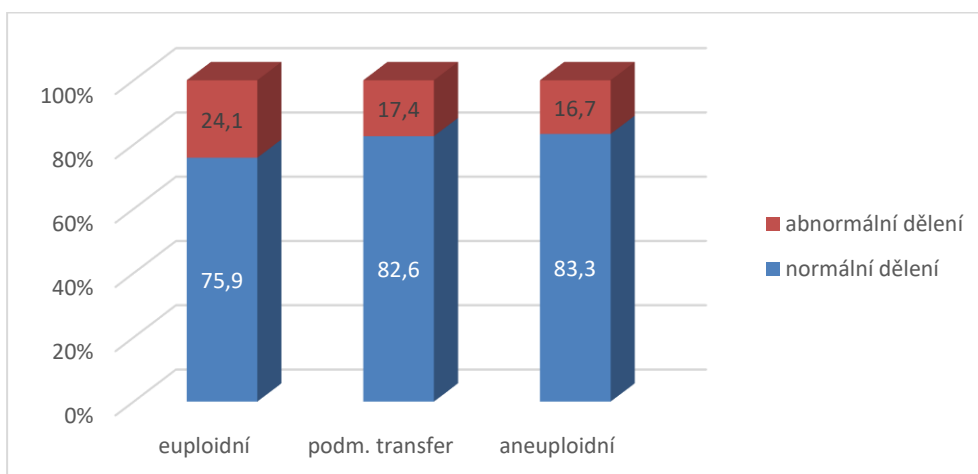
Porovnáním jednotlivých hodnot mezi embryi euploidními, podmíněně transferovatelnými a aneuploidními nelze určit jediný faktor, který by byl pro odhad ploidie jasně určující. Z Grafu 2 je zřejmá mírná tendence nárůstu počtu asymetricky se dělících embryí v 1. mitotickém dělení u aneuploidních oproti euploidním embryím. Podle Grafu 3 je u aneuploidních embryí vyšší procento abnormálních 1. mitotických dělení, avšak při 2. mitotickém dělení se ukázalo, že embrya euploidní mají dokonce větší procento abnormálních dělení než embrya aneuploidní (Graf 4). Z toho může vyplývat, že buňky vícebuněčného embrya mohou lépe korigovat případné následky abnormálního dělení.



Graf 2: Procentuální zastoupení asymetrických blastomer v 1. mitotickém dělení ve skupině euploidních, podmíněně transferovatelných a aneuploidních embryí.



Graf 3: Procentuální zastoupení abnormálních 1. mitotických dělení ve skupině euploidních, podmíněně transferovatelných a aneuploidních embryí.



Graf 4: Procentuální zastoupení abnormálních 2. mitotických dělení ve skupině euploidních, podmíněně transferovatelných a aneuploidních embryí.

I přestože byl použit pro sledování kontinuálního vývoje embryí time-lapse systém, který snímal embrya třikrát častěji než TLS ve většině porovnávaných prací, nevedla přesnější detekce morfokinetických rysů k odhalení parametrů s jednoznačným vztahem k ploidii. Do ukončení této studie bylo zatím provedeno 31 transferů, z toho bylo 28 embryí euploidních a 3 embrya podmíněně transferovatelná. 8 euploidních a 1 podmíněně transferovatelné embryo se vyvinulo v plod se srdeční aktivitou a všech těchto 9 těhotenství bylo završeno porodem živého a zdravého dítěte.

8 Závěr

Stále větší procento párů se potýká s neplodností, a to zvláště ve vyspělých zemích. V klinikách asistované reprodukce se na léčbě párů podílí celá řada odborníků, jelikož se jedná o složitý komplexní problém. Díky snaze o co největší úspěšnost léčby jsou stále vyvíjeny novější a přesnější metody diagnostiky, embryologické postupy a genetické metody.

Cílem embryologů je vybrat nejlepší embryo pro transfer, a to na základě všech dostupných metod. Nejefektivnějším způsobem výběru je kombinace genetického vyšetření embrya a jeho morfokinetického hodnocení. Jestliže výsledkem PGT-A je aneuploidie embrya, je toto embryo důrazně nedoporučeno k transferu nehledě na jeho morfokinetický vývoj. Z toho vyplývá, že genetické výsledky jsou nadřazeny morfokinetickému hodnocení. U většiny embryí však výsledky prenatalního genetického testování nejsou a embryolog musí vybrat embrya pouze na základě jejich morfologického, či morfokinetického vývoje.

Ve snaze odhalit konkrétní faktory určující životaschopnost embryí, vznikla řada studií, jejichž výsledky nebyly vždy homogenní. Při navržení určitého modelu pro odhad ploidie většinou výsledky původní studie mluvily pro jeho možnost zavedení do běžné praxe, avšak při provedení dalších studií, které užívaly stejného modelu pro vyhodnocování, se ukázal tento model jako nevhodný. Existuje však pár novějších studií, které mají kladné výsledky pro jejich hodnotící algoritmus, avšak ty stále čekají na jeho potvrzení nebo vyvrácení v budoucích robustnějších studiích. Na nerovnoměrnost výsledků studií může mít vliv také lidský individuální přístup a je tedy snahou objektivizovat hodnocení embryí algoritmem, při němž je eliminován subjektivní faktor. Ve všech pracích je však závěrem uvedeno, že samotným kontinuálním monitoringem není možné PGT-A nahradit.

Mnou provedená studie u 177 embryí také nedospěla k výsledku, že by v rané fázi vývoje lidských preimplantačních embryí do čtyřbuněčného stádia existoval určitý jednoznačný rys, který by dostatečně spolehlivě vypovídal o jejich ploidii.

9 Seznam použité literatury

- Adolfsson, Emma, Sandra Porath, a Anna Nowosad Andershed. 2018. „External Validation of a Time-Lapse Model; a Retrospective Study Comparing Embryo Evaluation Using a Morphokinetic Model to Standard Morphology with Live Birth as Endpoint." *JBRA assisted reproduction* 22(3): 205–14.
- Agarwal, Ashok et al. 2021. „Male Infertility." *Lancet (London, England)* 397(10271): 319–33.
- Alegre, L. et al. 2017. „Time-lapse technology combined with a novel automated analysis method for embryo selection; clinical validation". *Fertility and Sterility* 108(3): e239.
- Alfarawati, Samer et al. 2011. „The Relationship between Blastocyst Morphology, Chromosomal Abnormality, and Embryo Gender." *Fertility and sterility* 95(2): 520–24.
- Allahbadia, Gautam N. 2017. „Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited." *Journal of obstetrics and gynaecology of India* 67(6): 385–92.
- AU - Maggiulli, Roberta et al. 2019. „Human Blastocyst Biopsy and Vitrification". *JoVE* (149): e59625.
- Balakier, Hanna, Agata Sojecki, Gelareh Motamedi, a Clifford Librach. 2016. „Impact of Multinucleated Blastomeres on Embryo Developmental Competence, Morphokinetics, and Aneuploidy." *Fertility and sterility* 106(3): 608-614.e2.
- Barrie, Amy et al. 2017. „Examining the Efficacy of Six Published Time-Lapse Imaging Embryo Selection Algorithms to Predict Implantation to Demonstrate the Need for the Development of Specific, in-House Morphokinetic Selection Algorithms." *Fertility and sterility* 107(3): 613–21.
- Basile, Natalia et al. 2014. „Increasing the Probability of Selecting Chromosomally Normal Embryos by Time-Lapse Morphokinetics Analysis." *Fertility and sterility* 101(3): 699–704.
- Boué, J., Bou A, a P. Lazar. 1975. „Retrospective and Prospective Epidemiological Studies of 1500 Karyotyped Spontaneous Human Abortions." *Teratology* 12(1): 11–26.
- Bowen, P., a C. S. Lee. 1969. „Spontaneous Abortion. Chromosome Studies on 41 Cases and an Analysis of Maternal Age and Duration of Pregnancy in Relation to Karyotype." *American journal of obstetrics and gynecology* 104(7): 973–83.
- Braude, P., V. Bolton, a S. Moore. 1988. „Human Gene Expression First Occurs between the Four- and Eight-Cell Stages of Preimplantation Development." *Nature* 332(6163): 459–61.
- Calhaz-Jorge, C. et al. 2020. „Survey on ART and IUI: Legislation, Regulation, Funding and Registries in European Countries: The European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)." *Human reproduction open* 2020(1): hoz044.

- Campbell, Alison, Simon Fishel, Natalie Bowman, Samantha Duffy, Mark Sedler, a Cristina Fontes Lindemann Hickman. 2013a. „Modelling a Risk Classification of Aneuploidy in Human Embryos Using Non-Invasive Morphokinetics." *Reproductive biomedicine online* 26(5): 477–85.
- Campbell, Alison, Simon Fishel, Natalie Bowman, Samantha Duffy, Mark Sedler, a Simon Thornton. 2013b. „Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS". *Reproductive BioMedicine Online* 27(2): 140–46.
- Capalbo, Antonio et al. 2014. „Correlation between Standard Blastocyst Morphology, Euploidy and Implantation: An Observational Study in Two Centers Involving 956 Screened Blastocysts." *Human reproduction (Oxford, England)* 29(6): 1173–81.
- Capalbo A, Ubaldi FM, Rienzi L, Scott R, Treff N.. 2017. „Detecting Mosaicism in Trophectoderm Biopsies: Current Challenges and Future Possibilities." *Human reproduction (Oxford, England)* 32(3): 492–98.
- Coussa, Ayla, Hayder A. Hasan, a Thomas M. Barber. 2020. „Impact of Contraception and IVF Hormones on Metabolic, Endocrine, and Inflammatory Status." *Journal of assisted reproduction and genetics* 37(6): 1267–72.
- De Geyter, Christian. 2019. „Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance". *New reproductive technologies* 33(1): 3–8.
- Del Carmen Nogales, Maria et al. 2017. „Type of Chromosome Abnormality Affects Embryo Morphology Dynamics." *Fertility and sterility* 107(1): 229-235.e2.
- Diemer, T., A. Hauptmann, a W. Weidner. 2011. „[Treatment of azoospermia: surgical sperm retrieval (MESA, TESE, micro-TESE)]." *Der Urologe. Ausg. A* 50(1): 38–46.
- Fiegler, Heike et al. 2007. „High Resolution Array-CGH Analysis of Single Cells." *Nucleic acids research* 35(3): e15.
- Foresta, Carlo et al. 2005. „Genetic Abnormalities among Severely Oligospermic Men Who Are Candidates for Intracytoplasmic Sperm Injection." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(1): 152–56.
- Gallego, Raquel Del, José Remohí, a Marcos Meseguer. 2019. „Time-Lapse Imaging: The State of the Art†." *Biology of reproduction* 101(6): 1146–54.
- Gardner, D. K., a W. B. Schoolcraft. 1999. „Culture and Transfer of Human Blastocysts." *Current opinion in obstetrics & gynecology* 11(3): 307–11.
- Gazzo, Eduardo et al. 2020. „The Kidscore(TM) D5 Algorithm as an Additional Tool to Morphological Assessment and PGT-A in Embryo Selection: A Time-Lapse Study." *JBRA assisted reproduction* 24(1): 55–60.

- Gianaroli, L. et al. 1997. „Preimplantation Genetic Diagnosis Increases the Implantation Rate in Human in Vitro Fertilization by Avoiding the Transfer of Chromosomally Abnormal Embryos." *Fertility and sterility* 68(6): 1128–31.
- Gode, Funda et al. 2019. „Comparison of Microfluid Sperm Sorting Chip and Density Gradient Methods for Use in Intrauterine Insemination Cycles." *Fertility and sterility* 112(5): 842-848.e1.
- Handyside, A. H. et al. 1989. „Biopsy of Human Preimplantation Embryos and Sexing by DNA Amplification." *Lancet (London, England)* 1(8634): 347–49.
- Handyside, Alan H. 2011. „PGD and Aneuploidy Screening for 24 Chromosomes by Genome-Wide SNP Analysis: Seeing the Wood and the Trees." *Reproductive biomedicine online* 23(6): 686–91.
- Handyside AH. 2015. „Live Births Following Karyomapping - a ‚Key´ Milestone in the Development of Preimplantation Genetic Diagnosis." *Reproductive biomedicine online* 31(3): 307–8.
- Hardarson, T. et al. 2002. „Internalization of Cellular Fragments in a Human Embryo: Time-Lapse Recordings." *Reproductive biomedicine online* 5(1): 36–38.
- Hardy, K. et al. 1990. „Human Preimplantation Development in Vitro Is Not Adversely Affected by Biopsy at the 8-Cell Stage." *Human reproduction (Oxford, England)* 5(6): 708–14.
- Harrity, Conor et al. 2020. „EFFECT OF THE GERI INCUBATOR ON CLINICAL OUTCOMES IN FRESH TRANSFER ART CYCLES". *Fertility and Sterility* 114(3): e144–45.
- Hassold, T. et al. 1980. „A Cytogenetic Study of 1000 Spontaneous Abortions." *Annals of human genetics* 44(2): 151–78.
- Hassold, T., a P. Hunt. 2001. „To Err (Meiotically) Is Human: The Genesis of Human Aneuploidy." *Nature reviews. Genetics* 2(4): 280–91.
- Hlinka, D. et al. 2012. „[Non-invasive monitoring of the timing of early embryo cleavages--objectively measurable predictor of human embryo viability]." *Ceska gynekologie* 77(1): 52–57.
- Howie, Ruth, a Vanessa Kay. 2018. „Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization". *British Journal of Hospital Medicine* 79(4): 194–99.
- Hu, Jingmei et al. 2015. „Liquid Nitrogen Vapor Is Comparable to Liquid Nitrogen for Storage of Cryopreserved Human Sperm: Evidence from the Characteristics of Post-Thaw Human Sperm." *Fertility and sterility* 104(5): 1253-1257.e1-2.
- Huszar, G., M. Willetts, a M. Corrales. 1990. „Hyaluronic Acid (Sperm Select) Improves Retention of Sperm Motility and Velocity in Normospermic and Oligospermic Specimens." *Fertility and sterility* 54(6): 1127–34.

- Chawla, Monika et al. 2015. „Morphokinetic Analysis of Cleavage Stage Embryos and Its Relationship to Aneuploidy in a Retrospective Time-Lapse Imaging Study." *Journal of assisted reproduction and genetics* 32(1): 69–75.
- Katayama, K. P. et al. 1988. „Ultrasound-Guided Transvaginal Needle Aspiration of Follicles for in Vitro Fertilization." *Obstetrics and gynecology* 72(2): 271–74.
- Kimelman, Dana et al. 2019. „Assessing the Impact of Delayed Blastulation Using Time Lapse Morphokinetics and Preimplantation Genetic Testing in an IVF Patient Population." *Journal of assisted reproduction and genetics* 36(8): 1561–69.
- Kramer, Yael G. et al. 2014. „Assessing Morphokinetic Parameters via Time Lapse Microscopy (TLM) to Predict Euploidy: Are Aneuploidy Risk Classification Models Universal?" *Journal of assisted reproduction and genetics* 31(9): 1231–42.
- Kratochvílová, Irena et al. 2017. „Theoretical and Experimental Study of the Antifreeze Protein AFP752, Trehalose and Dimethyl Sulfoxide Cryoprotection Mechanism: Correlation with Cryopreserved Cell Viability." *RSC advances* 7(1): 352–60.
- Laws-King, A., A. Trounson, H. Sathananthan, a I. Kola. 1987. „Fertilization of Human Oocytes by Microinjection of a Single Spermatozoon under the Zona Pellucida." *Fertility and sterility* 48(4): 637–42.
- Le Caignec, Cedric et al. 2006. „Single-Cell Chromosomal Imbalances Detection by Array CGH." *Nucleic acids research* 34(9): e68.
- Li, Ryh-Sheng et al. 2018. „Day 4 Good Morula Embryo Transfer Provided Compatible Live Birth Rate with Day 5 Blastocyst Embryo in Fresh IVF/ET Cycles." *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* 57(1): 52–57.
- Majumdar, Gaurav, a Abha Majumdar. 2013. „A Prospective Randomized Study to Evaluate the Effect of Hyaluronic Acid Sperm Selection on the Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome of Patients with Unexplained Infertility Having Normal Semen Parameters." *Journal of assisted reproduction and genetics* 30(11): 1471–75.
- Menasha, Joshua, Brynn Levy, Kurt Hirschhorn, a Nataline B. Kardon. 2005. „Incidence and Spectrum of Chromosome Abnormalities in Spontaneous Abortions: New Insights from a 12-Year Study." *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 7(4): 251–63.
- Meseguer, Marcos et al. 2011. „The Use of Morphokinetics as a Predictor of Embryo Implantation." *Human reproduction (Oxford, England)* 26(10): 2658–71.
- Minasi, Maria Giulia et al. 2016. „Correlation between Aneuploidy, Standard Morphology Evaluation and Morphokinetic Development in 1730 Biopsied Blastocysts: A Consecutive Case Series Study." *Human reproduction (Oxford, England)* 31(10): 2245–54.

- Mukaida, T. et al. 1998. „Vitrification of Human Embryos Based on the Assessment of Suitable Conditions for 8-Cell Mouse Embryos." *Human reproduction (Oxford, England)* 13(10): 2874–79.
- Munné, S. et al. 1993. „Diagnosis of Major Chromosome Aneuploidies in Human Preimplantation Embryos." *Human reproduction (Oxford, England)* 8(12): 2185–91.
- Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohert J, Gianaroli L. 1998. „Preimplantation Diagnosis of the Aneuploidies Most Commonly Found in Spontaneous Abortions and Live Births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22." *Prenatal diagnosis* 18(13): 1459–66.
- Munné, S., H. U. Weier, J. Grifo, a J. Cohen. 1994. „Chromosome Mosaicism in Human Embryos." *Biology of reproduction* 51(3): 373–79.
- Munné, Santiago et al. 2019. „Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy versus Morphology as Selection Criteria for Single Frozen-Thawed Embryo Transfer in Good-Prognosis Patients: A Multicenter Randomized Clinical Trial." *Fertility and sterility* 112(6): 1071-1079.e7.
- Navratil, Rostislav et al. 2020. „Concordance of Various Chromosomal Errors among Different Parts of the Embryo and the Value of Re-Biopsy in Embryos with Segmental Aneuploidies." *Molecular human reproduction* 26(4): 269–76.
- Nussbaum, Robert L., Roderick R. McInnes, a Huntington F. Willard. 2004. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton.
- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, a A. C. Van Steirteghem. 1992. „Pregnancies after Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon into an Oocyte." *Lancet (London, England)* 340(8810): 17–18.
- Payne, D., S. P. Flaherty, M. F. Barry, a C. D. Matthews. 1997. „Preliminary Observations on Polar Body Extrusion and Pronuclear Formation in Human Oocytes Using Time-Lapse Video Cinematography." *Human reproduction (Oxford, England)* 12(3): 532–41.
- Reignier, Arnaud et al. 2019. „Performance of Day 5 KIDScore™ Morphokinetic Prediction Models of Implantation and Live Birth after Single Blastocyst Transfer." *Journal of assisted reproduction and genetics* 36(11): 2279–85.
- Rienzi, L. et al. 2015. „No Evidence of Association between Blastocyst Aneuploidy and Morphokinetic Assessment in a Selected Population of Poor-Prognosis Patients: A Longitudinal Cohort Study." *Reproductive biomedicine online* 30(1): 57–66.
- Rubio, Irene et al. 2012. „Limited Implantation Success of Direct-Cleaved Human Zygotes: A Time-Lapse Study." *Fertility and sterility* 98(6): 1458–63.
- Russell, Darryl L., a Antonietta Salustri. 2006. „Extracellular Matrix of the Cumulus-Oocyte Complex." *Seminars in reproductive medicine* 24(4): 217–27.

- Řezáčová, Jitka. 2018. *Reprodukční medicína: současné možnosti v asistované reprodukci*. První vydání. Praha: Mladá fronta a. s. <https://www.medvik.cz/link/MED00194829>.
- Scriven, Paul N., Toby L. Kirby, a Caroline Mackie Ogilvie. 2011. „FISH for Pre-Implantation Genetic Diagnosis." (48).
- Segal, Thalia R., a Linda C. Giudice. 2019. „Before the Beginning: Environmental Exposures and Reproductive and Obstetrical Outcomes." *Fertility and sterility* 112(4): 613–21.
- Schlegel, P. N. 1999. „Testicular Sperm Extraction: Microdissection Improves Sperm Yield with Minimal Tissue Excision." *Human reproduction (Oxford, England)* 14(1): 131–35.
- Stephens, P. C., a R. G. Edwards. 1978. „Birth after the Reimplantation of a Human Embryo." *Lancet (London, England)* 2(8085): 366.
- Tan, Yueqiu et al. 2014. „Clinical Outcome of Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening Using next Generation Sequencing." *GigaScience* 3(1): 30.
- Temple-Smith, P. D. et al. 1985. „Human Pregnancy by in Vitro Fertilization (IVF) Using Sperm Aspirated from the Epididymis." *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer : IVF* 2(3): 119–22.
- „The Istanbul Consensus Workshop on Embryo Assessment: Proceedings of an Expert Meeting." 2011. *Human reproduction (Oxford, England)* 26(6): 1270–83.
- Tiitinen, Aila. 2019. „Single embryo transfer: Why and how to identify the embryo with the best developmental potential". *New reproductive technologies* 33(1): 77–88.
- Trávník, Pavel. 2018. *Klinická embryologie*. Mladá fronta a.s.
- Ubaldi, Filippo Maria et al. 2015. „Reduction of Multiple Pregnancies in the Advanced Maternal Age Population after Implementation of an Elective Single Embryo Transfer Policy Coupled with Enhanced Embryo Selection: Pre- and Post-Intervention Study". *Human Reproduction (Oxford, England)* 30(9): 2097–2106.
- Vajta, Gábor, Laura Rienzi, a Filippo Maria Ubaldi. 2015. „Open versus Closed Systems for Vitrification of Human Oocytes and Embryos." *Reproductive biomedicine online* 30(4): 325–33.
- Van Blerkom, J., P. Davis, a S. Alexander. 2001. „A Microscopic and Biochemical Study of Fragmentation Phenotypes in Stage-Appropriate Human Embryos." *Human reproduction (Oxford, England)* 16(4): 719–29.
- Vander Borght, Mélodie, a Christine Wyns. 2018. „Fertility and Infertility: Definition and Epidemiology." *Clinical biochemistry* 62: 2–10.
- Verlinsky, Y. et al. 1995. „Pregnancies Following Pre-Conception Diagnosis of Common Aneuploidies by Fluorescent in-Situ Hybridization." *Human reproduction (Oxford, England)* 10(7): 1923–27.

- Worton, R. G. 1977. „Chromosome Abnormalities: A Major Cause of Birth Defects, Stillbirth and Spontaneous Abortion." *Canadian Medical Association journal* 117(8): 849, 51.
- Yang, Zhihong et al. 2014. „Selection of Competent Blastocysts for Transfer by Combining Time-Lapse Monitoring and Array CGH Testing for Patients Undergoing Preimplantation Genetic Screening: A Prospective Study with Sibling Oocytes." *BMC medical genomics* 7: 38.
- Zacchini, Federica, Roberta Arena, Adam Abramik, a Grazyna E. Ptak. 2017. „Embryo Biopsy and Development: The Known and the Unknown." *Reproduction (Cambridge, England)* 154(5): R143–48.
- Zegers-Hochschild, Fernando et al. 2017. „The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017". *Fertility and Sterility* 108(3): 393–406.
- Zhao, Yulian et al. 2011. „In vitro fertilization: Four decades of reflections and promises". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810(9): 843–52.
- Zheng, Danni et al. 2019. „Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) versus Conventional in Vitro Fertilisation (IVF) in Couples with Non-Severe Male Infertility (NSMI-ICSI): Protocol for a Multicentre Randomised Controlled Trial." *BMJ open* 9(9): e030366.
- Zorrilla, Michelle, a Alexander N. Yatsenko. 2013. „The Genetics of Infertility: Current Status of the Field." *Current genetic medicine reports* 1(4).

10 Internetové zdroje

URL 1: <https://hcp.merckgroup.com/en/fertility/technologies/Geri/Geri-How-it-works.html>

URL 2: <https://hcp.merckgroup.com/en/fertility/technologies/Geri/Geri-Continuous-embryo-monitoring.html>

URL 3: <https://www.ivfserum.com/2020/04/24/blastocyst-grading-system/>

URL 4: <https://slg.cz/doporuceni/reprodukcnigenetika/preimplantacni-vysetreni/>

URL 5: https://pgdis.org/docs/newsletter_052719.pdf