

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Terezie Černíková**

**Hodnocení kvality časných lidských embryí z pohledu jejich vývojové kompetence**

**Quality evaluation of early human embryos regarding their developmental competence**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2018

## **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 ani stejného akademického titulu.

V Praze dne, 5. 5. 2018

Terezie Černíková

## **Poděkování**

Především bych ráda poděkovala svému školiteli panu doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, Ph.D. za ochotu a čas, který věnoval vedení této práce. Zejména pak za jeho komentáře a připomínky, které jí pomohly obohatit. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu, která mě dovedla k zdárnému dokončení práce.

## **Abstrakt**

Posláním asistované reprodukční medicíny je pokud možno co nejvyšší úspěšnost implantace a následné narození zdravého dítěte. Současným standardem je přenos pouze jednoho embrya a tím je daný požadavek na výzkum a vývoj objektivních a přesných metod evaluace embryí. Bakalářská práce tvoří přehled několika vybraných metod a postihuje jejich výhody a nevýhody. Výběr metod pro potřeby této práce spočívá v jejich potenciálním přínosu pro hodnocení embryí, v množství a dostupnosti pojednávajících studií. Cílem práce je porovnání klasického morfologického přístupu s nově vyvinutými metodami sledujícími biomarkery životnosti embrya, včetně genetické, metabolické a proteomické analýzy. V důsledku deficitu informací o všech metodách z klinické praxe a velkých randomizovaných studií je srovnávání nových a starých metod diskutabilní. Srovnávat momentálně lze jejich principiální rozdíly. Konvenční morfologické hodnocení se zakládá do velké míry na subjektivním úsudku hodnotitele a oproti tomu, metody sledující biomarkery jsou založené na empirickém měření dat. Výhledem do budoucna je komplementarita metod sledujících biomarkery vůči morfologickému hodnocení.

**Klíčová slova:** časná embrya, člověk, vývojová kompetence, hodnocení.

## **Abstract**

The mission of assisted reproductive medicine is to achieve the highest success rate of implantation and the subsequent birth of a healthy child. The current standard is the transfer of only one embryo and thus there is a great effort to develop an unbiased and accurate embryo assessment methods. This bachelor thesis is an overview of several selected techniques and their advantages and disadvantages. The selection of methods included in this thesis is based on their potential contribution to embryo assessment and the number and availability of relevant studies. I tried to compare the classical morphological approach with the newly developed methods monitoring vitality biomarkers, including genetic, metabolic and proteomic analysis. Because of the lack of information concerning techniques from clinical practice and large randomized trials, the comparison of new and old methods is questionable. Nevertheless, their principal differences can be compared. Conventional morphological assessment is based on the large extent of the subjective assessment by the assessor. On the other hand biomarker monitoring methods are based on empirical data. The outlook for the future is the complementarity of biomarker monitoring to morphological assessment.

**Key words:** early embryo, human, developmental competence, evaluation.

## Seznam zkratek

<b>IVF</b>	<i>in vitro fertilization</i>
<b>ZP</b>	<i>zona pellucida</i>
<b>ICM</b>	inner cell mass- embryoblast
<b>TE</b>	trophectoderm- trofoblast
<b>ICSI</b>	intracytoplasmic sperm injection- intracytoplazmatická injekce spermií
<b>beta hCG</b>	free beta human chorionic gonadotropin- volný beta lidský choriogonadotropin
<b>ATP</b>	adenosin triphosphate- adenosintrifosfát
<b>PAF</b>	platelet activating factor- faktor aktivující destičky
<b>HLA-G</b>	human leukocyte antigen-G- lidský leukocytární antigen-G
<b>BRCA1/BRCA2</b>	breast cancer 1/2- tumor supresorové geny
<b>PGD</b>	preimplantation genetic diagnosis- preimplantační genetická diagnóza
<b>PGS</b>	preimplantation genetic screening- preimplantační genetický screening
<b>PB</b>	polar bodies- polární tělíška
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction- polymerázová řetězová reakce
<b>ADO</b>	allele-drop out- ztráta jedné ze dvou alel
<b>FISH</b>	fluorescent in situ hybridization- fluorescenční in situ hybridizace
<b>CGH</b>	comparative genome hybridization- komparativní genetická hybridizace
<b>aCGH</b>	microarray comparative genome hybridization- komparativní genetická hybridizace na čípech
<b>NGS</b>	next generation sequencing- sekvenování nové generace

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Blastogeneze</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Morfologické hodnocení raných embryí</b> .....	<b>3</b>
3.1	Morfologické hodnocení embrya ve fázi rýhování.....	3
3.1.1	Synchronizace dělení a počet blastomer.....	3
3.1.2	Fragmentace.....	4
3.1.3	Velikost a tvar blastomer.....	4
3.1.4	Vícejadernost (Multinukleace) .....	5
3.1.5	Cytoplazmatické anomálie .....	5
3.1.6	Kompaktace .....	6
3.2	Morfologické hodnocení blastocysty .....	6
3.2.1	Dokrasův systém.....	7
3.2.2	Gardnerův systém .....	7
3.2.3	Zjednodušený systém dle Richardsonové .....	8
3.2.4	Morfologické charakteristiky a jejich vliv na implantaci .....	9
3.3	Morfologické hodnocení embryí pomocí Time-lapse.....	10
3.3.1	Kinetické parametry .....	10
3.3.2	Bezpečnost time-lapse systémů .....	12
<b>4</b>	<b>Hodnocení kvality embryí pomocí biomarkerů</b> .....	<b>13</b>
4.1	Metabolismus embrya jako prediktor kvality.....	13
4.1.1	Metabolismus sacharidů .....	13
4.1.2	Metabolismus aminokyselin.....	14
4.1.3	Metabolismus kyslíku .....	15
4.2	Analýza sekretomu .....	16
4.3	Genomické hodnocení kvality embryí.....	16
4.3.1	Biopsie .....	17
4.3.2	Analytické metody.....	19
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>Seznam literatury</b> .....	<b>24</b>

## 1 Úvod

In vitro fertilizace (dále jen IVF) je jednou z nejrychleji rozvíjející se oblastí medicíny. Od svého zavedení bylo počato *in vitro* 3% dětí ze všech narozených v Evropě. I přes neustálý vývoj v této oblasti je úspěšnost narození živého dítěte po IVF léčbě relativně nízká. Přibližně dva ze tří IVF cyklů nevedou k úspěšnému těhotenství, což způsobuje fyzické, emoční a finanční potíže pacientům podstupujícím léčbu neplodnosti. Statistiky ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) z roku 2013 dokládají přibližně 30 % úspěšnost v dosažení klinického těhotenství během jednoho cyklu po IVF. Za účelem maximalizace úspěšnosti se dříve přenášelo více embryí během jednoho cyklu. Od této praxe se v nynější době ustupuje, jelikož vícečetné těhotenství představuje zdravotní riziko předčasného porodu a zvýšenou pravděpodobnost celoživotního postižení dítěte. Přenos jednoho embrya je jediná účinná strategie pro zabránění vícečetnému těhotenství po asistované reprodukci. Z tohoto důvodu je vývoj přesného a objektivního evaluačního systému, který snižuje vznik vícečetných těhotenství, ale zároveň zvyšuje celkové procento úspěšnosti, jedním z nejvýznamnějších cílů asistované reprodukce. Většina současných klasifikačních systémů, které se opírají o vizuální kontrolu morfologických vlastností embrya, je založena na subjektivním hodnocení a může tak vést k variabilitě závěrů mezi embryology. V posledních letech se výzkum zaměřil na nalezení biomarkerů životaschopnosti embryí a rozvoj nových metod pro výběr nejvíce životaschopného zárodku. Tyto metody využívají data získaná z měření vývojové kinetiky, metabolismu, analýzy sekretu embryí a genetické diagnostiky. Některé jsou více slibné, jiné méně pro užití v asistované reprodukci. Otázkou je zda dokáží nové technologie překonat léty prověřené morfologické hodnocení a zkušenosti embryologů.

## 2 Blastogeneze

Termínem blastogeneze myslíme průběh od oplození přes rýhování až po vznik blastocysty. Níže si stručně popíšeme stádia raného vývoje lidských embryí.

Lidský oocyt je oligolecitální a izolecitální, což znamená, že obsahuje malé množství žloutku, který je rovnoměrně rozložený v cytoplazmě oocytu. Z tohoto důvodu se rýhuje holoblasticky, tzv. dělí se celý objem embrya. Rozdělení vajíčka na dvoubuněčné stadium bylo zaznamenáno cca 24-30 hodin po oplození. Buňky časného embrya nazýváme blastomery. Savčí rýhování je asynchronní, což je pravděpodobně způsobeno inkluzemi žloutku v cytoplazmě. Můžeme tedy během vývoje sledovat třibuněčné i pětibuněčné stadium. Větší blastomera se vždy začne dělit o něco dříve (Vacek, 2006). Do osmibuněčného stadia tvoří buňky shluk a rýhy jsou lehce znatelné. Od třetího rýhovacího dělení začíná proces kompaktace, kdy se mezi buňkami začnou vytvářet těsné kontakty (Sadler, 2011).

Čtvrtý den po oplození, ve stadiu moruly (16 blastomer), vstupuje zárodek do děložní dutiny. Rýhy na jeho povrchu již nejsou tak zřetelné a povrch se jeví hladší. V této době jsou buňky kompaktní a začínají první kroky diferenciací (Vacek, 2006). Během tohoto procesu se vyčlení buňky vnitřní, které spolu začnou komunikovat přes propustná spojení (gap junction) a vnější buňky, které vytvoří těsná spojení (tight junction)(Sadler, 2011).

Zóna pellucida (ZP) se po vstupu embrya do dělohy stane propustnější pro tekutinu, která se začne hromadit mezi buňkami vnitřní buněčné masy a vnějšími obalovými buňkami. Takto se vytvoří vnitřní dutina blastocysty, tzv. blastocoel. Hromadění vody v dutině je zapříčiněno transportem  $\text{Na}^+$  iontů do blastocoelu. Na bazální membráně vnějších obalových buněk se nachází Na/K ATPázová pumpa, která pumpuje intracelulární  $\text{Na}^+$  do dutiny. Sodné ionty vytvoří osmotický gradient, který zapříčiní pasivní difuzi vody dovnitř dutiny (Watson, 1992).

Buňky vnitřní buněčné masy se dále přemění na embryoblast (ICM) a vnější blastomery na trofoblast (TE). Zona pellucida, která obalovala blastomery, se na konci čtvrtého dne rozpadá. Další dva dny existuje blastocysta volně. Šestý až sedmý den se začne implantovat do děložní sliznice (Vacek, 2006).

### 3 Morfologické hodnocení raných embryí

Morfologické hodnocení gamet a embryí se používá už od počátku zavedení technik asistované reprodukce. Nejdříve šlo o studium průběhu vývoje embrya, aktuálně se používá k výběru nejkvalitnějšího embrya s nejvyšším implantačním potenciálem (Machtinger et. al. 2013). Níže popisují základní kvalitativní parametry používané pro hodnocení embrya v raném stadiu vývoje a vybrané systémy vyvinuté pro hodnocení embrya ve stadiu blastocysty.

#### 3.1 Morfologické hodnocení embrya ve fázi rýhování

Fáze dělicího se embrya se pohybuje v časovém rozmezí od prvního dělení až po zhutnění moruly složené z 8-16 buněk (Prados et. al., 2012). Obecně jsou za klíčová kritéria při výběru nejživotaschopnějšího embrya považována: morfologie blastomer (počet, velikost, souměrnost), stupeň fragmentace, výskyt vícejaderných blastomer, kompaktace a anomálie v cytoplazmě.

##### 3.1.1 Synchronizace dělení a počet blastomer

Počet buněk je základní morfologická charakteristika používaná při hodnocení kvality embryí. Signifikantní je načasování dělení a počet blastomer v dané fázi vývoje. V roce 2011 byl na konferenci v Istanbulu přijat časový plán dělení optimálního zárodku (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology et al., 2011).

1. den ( $26 \pm 1$  hod. post-ICSI,  $28 \pm 1$  hod. post-IVF), 2-buňky
2. den ( $44 \pm 1$  hod.), 4-buňky
3. den ( $68 \pm 1$  hod.), 8-buněk

Několik studií prokázalo, že embrya, u kterých došlo k první mitóze mezi 24-27 hod., korelují s lepší kvalitou a implantací zárodků. Taková embrya se nazývají *early cleavage*, embrya s pozdějším nástupem dělení označujeme jak *non-early cleavage* (Shoukir et al., 1997). Kromě toho embrya s časným dělením mají rovnoměrnější rýhování, což souvisí s nižším výskytem chromozomálních abnormalit (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology et al., 2011). Na druhou stranu embrya, která se začala dělit dříve než 20h. po oplození mají horší prognózy (Hardarson et al., 2006).

### 3.1.2 Fragmentace

Fragmentace definujeme jako malé části cytoplazmy ohraničené plazmatickou membránou obvykle neobsahující DNA. Fragmentace vznikají převážně v souvislosti s dělením buněk (Alikani et al., 1999). Nejjednodušším systémem hodnocení fragmentace je porovnání jeho procentuálního zastoupení v cytoplazmě embrya (Machtinger, 2013).

- 0% - žádné fragmenty
- <10% - méně než 10% fragmentů
- 10-25% - více než 10% ale méně než 25% fragmentů
- >25% - více než 25% fragmentů

Bylo prokázáno, že vysoký stupeň fragmentace souvisí s nízkými hodnotami implantace a větší pravděpodobností výskytu aneuploidie (Ebner et al., 2001; Racowsky et al., 2011), zatímco u zárodků s nižším počtem fragmentací (<10%) nebyl nalezen žádný negativní dopad (Alikani et al., 1999). Zásadní vliv má i typ fragmentace. Při tvorbě velkých fragmentů v rané fázi vývoje přijde embryo o značné množství cytoplazmy s důležitými organelami např. mitochondrie. Pokud dojde k fragmentaci první nebo druhý den vývoje embrya, může dojít ke ztrátě regulačních proteinů, což může podstatně ovlivnit další rozvoj zárodku (Alikani et al., 1999). Dalším důležitým faktorem je rozmístění fragmentace. Rozlišujeme dva typy: koncentrované a rozptýlené fragmenty. Rozptýlené fragmenty po celém embryu se spojují se zvýšeným výskytem chromozomálních abnormalit, např. mozaicismus, jelikož vznikají z několika nebo ze všech blastomer, a proto je považujeme za závažnější (Magli et al., 2007).

### 3.1.3 Velikost a tvar blastomer

Symetrie dělení nám definuje velikost a tvar blastomer. Nepravidelné rýhování tvoří rozdílně velké buňky, což může vést k nerovnoměrnému rozdělení cytoplazmatických molekul, jako jsou proteiny a mRNA apod. (Hardarson et al., 2001; Magli et al., 2001). Blastomery 2-, 4-, 8-buněčného embrya by měly být v ideálním případě stejně velké. V důsledku asynchronního rozdělení jedné nebo více blastomer může vznikat např. 3- buněčné embryo, které by mělo mít naopak jednu velkou a dvě menší blastomery. 5- buněčné embryo by mělo mít tři velké a dvě

malé blastomery atd. Takovéto velikosti jsou specifické pro danou fázi vývoje a hodnotíme je kladně. Nicméně embrya s výrazně asymetrickými blastomerami nespecifickými pro danou fázi vývoje mají nižší úspěšnost při implantaci (Prados et al., 2012).

### **3.1.4 Vícejadernost (Multinukleace)**

Multinukleaci hodnotíme 1. 2. a 3. den vývoje. Klasifikace 3. den je obtížnější kvůli složitější morfologii embrya (Royen, 2003). Sledujeme přítomnost jader v blastomeře, kdy více jak jednoho jádro alespoň v jedné buňce považujeme za neobvyklé. V mnoha studiích se prokázala souvislost mezi multinukleací a sníženým potenciálem implantace, klinickým těhotenstvím a živým narozením fetu (Jackson et al., 1998; Royen, 2003). Procento výskytu multinukleace na pacienta (léčbu) se značně liší. Ve studii Balakier and Cadesky (1997) uvedli, že alespoň 44% procent pacientů mělo jedno nebo více vícejaderných embryí, zatímco Royen et al. (2003) objevili až 87% výskytů multinukleace u všech pacientů a 33.6% vícejaderných embryí z celkového počtu.

Multinukleace je více častá u embryí s nesouměrnými blastomerami vzniklými během nepravidelného dělení, což vede k chromozomálním aberacím (Hardarson et al., 2001). Byly navrženy 3 možné mechanismy způsobující multinukleaci:

- karyokineze bez cytokinene
- částečná fragmentace jader nebo
- defektní migrace v anafázi (Staessen and Van Steirteghem, 1998).

### **3.1.5 Cytoplazmatické anomálie**

Morfologické vlastnosti jako jsou prohlubně v cytoplazmě, granulocyty či přítomnost vakuol, se mohou používat jako aditivní faktor při hodnocení embryí. Nicméně neexistují studie, které by prokazovaly jejich význam při vývoji embrya (Prados et al., 2012). Přítomnost vakuol je pravděpodobně nejběžnější odchylkou nacházející se v cytoplazmě lidských embryí. Vakuoly se liší ve velikosti a množství. Na konferenci v Istanbulu bylo stanoveno, že menší vakuoly o průměru (5–10  $\mu\text{m}$ ) nemají negativní dopad na vývoj embrya, zatímco větší vakuoly o průměru (>14  $\mu\text{m}$ ) mohou zasahovat do dělení zárodku (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology et al., 2011).

### **3.1.6 Kompaktace**

Míra kompaktace buněk se hodnotí čtvrtý den vývoje embrya tj. ve stadiu moruly. Kvalitní morulu tvoří 16-32 blastomer, které jsou všechny zapojeny v procesu kompaktace (Tao et al., 2002). Několik málo vyloučených blastomer nepovažujeme za signifikantní, jelikož mohou být opožděné ve vývoji a mohou projít procesem kompaktace později. Výjimkou jsou zárodky, které mají více jak polovinu blastomer vyloučených z procesu zhutňování, ty spojujeme se špatnou prognózou (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Zvýšená přilnavost mezi buňkami začíná v 8-buněčném stadiu a zrychluje se s dalším vývojem. Studie provedená Skiadas et al. (2006) ukázala, že brzký začátek kompaktace (fáze 8 buněk) zvyšuje pravděpodobnost implantace. Nicméně to platí jen pro embrya s fragmentací menší než 10%. Naopak u embryí s fragmentací větší než 10% byla časná kompaktace spojena s nižším implantačním potenciálem. Možná vysvětlení jsou: fragmentace poškozuje kompaktační procesy nebo představuje mechanismus apoptózy.

Zvýšená adheze buněk začíná ve chvíli, kdy se změní distribuce adhezivního proteinu E-kadherinu a postupuje z cytoplazmy k membránám buněk (Alikani, 2005). Tento proces je spojen s aktivací genomu embrya a z toho důvodu je považován za dobrý signál v dalším vývoji (Desai et al., 2000).

## **3.2 Morfologické hodnocení blastocysty**

V následující kapitole si popíšeme dva známé klasifikační systémy navržené Dokrasem et al. (1993) a Gardner and Schoolcraft, (1999a). Mnoho dalších studií vychází z těchto dvou systémů a modifikuje je např. systém podle Richardson et al. (2015a) viz níže.

Prodloužená kultivace embryí do stadia blastocysty se stala rutinní praxí v IVF centrech už od roku 1999. Zásahu na tom má mimo jiné modifikace medií pro kultivaci embryí. Většina současných kultivačních medií umožňuje dosáhnout stupně blastocysty více jak 50% embryím (Kovacic et al., 2004). Jedna z hlavních výhod kultivace blastocyst je možnost výběru embrya s již aktivovaným embryonálním genomem, což je dobrý indikátor úspěšnosti implantace. Celkově se přenos embrya do dělohy ve stadiu blastocysty ukázal být účinnější než přenos embrya ve třetím dni vývoje. (Braude et al., 1988; Kovačič and Vlaisavljević, 2012).

### 3.2.1 Dokrasův systém

První hodnotící systém blastocyst vytvořil Dokras et al. (1993). Parametry hodnotícího systému jsou kavitace, expanze dutiny blastocoelu a ICM. Platnost této klasifikace byla potvrzena změřením sekrece beta-hCG jednotlivých blastocyst rostoucích na buňkách v kultuře (Balaban et al., 2000). Balaban et al. (2006) zkoumali dopad Dokrasova hodnotícího systému na klinické výsledky po transferu. Zajímavé bylo zjištění absence podstatného rozdílu mezi 1. a 2. stupněm, co se týče úspěšnosti nidace a klinického těhotenství. Transfer blastocysty 3. stupně vedl k nízkým klinickým výsledkům (Balaban et al., 2006).

- Blastocysty 1. stupně jsou charakterizovány časnou kavitací vedoucí k vytvoření vnitřní dutiny s výraznou oblastí vnitřní buněčné hmoty a vrstvou trofoblastu;
- Blastocysty 2. stupně vykazují přechodnou fázi, kde jsou viditelné jednotlivé nebo vícenásobné vakuoly, poté se ale vyvinou do blastocysty 1. stupně;
- Blastocysty 3. stupně jsou definovány jako blastocysty s degenerativními ložisky v ICM, s buňkami tmavými a nekrotickými.

### 3.2.2 Gardnerův systém

Podrobnější a v praxi více užívaný bodovací systém navrhnul Gardner and Schoolcraft, 1999. Systém pracuje se třemi morfologickými parametry: expanzí blastocoelu, velikostí a soudržností ICM a TE. Expanzi blastocoelu a stav hatching popisuje číselná hodnota 1-6. Hodnocení stavu ICM a TE je možné jen u zralých blastocyst (3-6) a bodujeme je pomocí písmen A, B a C dle jejich morfologie (Balaban et al., 2006). Gardner and Schoolcraft, (1999) ve své studii se 48 zdravými ženami dosáhli až 60% úspěchu v implantaci a klinickém těhotenství po přenosu jedné blastocysty se stupněm kvality 3AA a lepší (Balaban et al., 2006).

Stupeň vývoje blastocysty:

- 1 - raná blastocysta: blastocel zabírá méně než polovina objemu embrya;
- 2 - blastocysta: blastocel je větší nebo roven polovině objemu embrya;
- 3 - plná blastocysta: blastocel zcela vyplňuje embryo;
- 4 - expandovaná blastocysta: objem blastocelu je větší než časné embryo a ZP se ztenčuje;

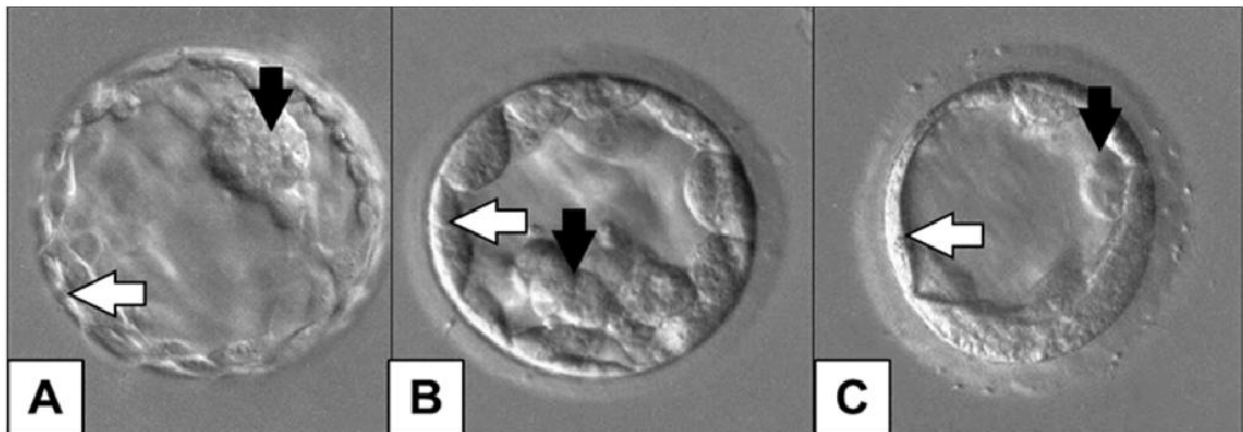
- 5 - líhnoucí se blastocysta: trofoblast se protlačuje skrz ZP;
- 6 - blastocysta se vylíhnula a úplně se zbavila ZP.

Stupeň kvality ICM:

- A - dobře kompaktní, obsahující mnoho buněk;
- B - volně seskupené, obsahující několik buněk;
- C - tvořeno jen velmi málo buňkami.

Stupeň kvality TE:

- A - mnoho buněk tvořící pevně spletený epitel;
- B - několik málo buněk tvořící epitel;
- C - velmi málo buněk tvořící volný epitel.



Obr. 1: Stupně kvality ICM (černá šipka) a TE (bílá šipka). Převzato z Kovačič and Vlaisavljević, (2012).

### 3.2.3 Zjednodušený systém dle Richardsonové

Gardnerův systém hodnocení používá většina IVF klinik. Na druhou stranu touto klasifikací dosáhneme až 54 různých permutací, což vede k variabilitě hodnocení embryologů (inter-observační variace) a také k variabilitě hodnocení jednoho embryologa, který ohodnotí stejné embryo při jiné příležitosti (intra-observační variace)(Richardson et al., 2015b).

Ve studii se kolektiv Richardsonové pokusil o zjednodušení Gardnerova systému. Jakékoliv blastocystě s úplnou expanzí (stupně 4, 5, 6 Gardnerova systému), s ICM a TE ohodnocenými A nebo B byla přiřazena třída A. Blastocysta, která nebyla plně rozšířená, ale měla kvalitní ICM a TE (stupně A nebo B), byla zařazena do třídy B. Blastocysta s ohodnocením ICM nebo TE stupněm C vykazovala nejnižší hodnoty implantace bez ohledu na stav expanze, byla tedy zařazena do třídy C. Výsledky studie Richardsonové prokázaly, že díky zjednodušenému systému jsme schopni predikovat míru implantace, klinického těhotenství a živého porodu. Dále se díky zjednodušenému systému snížila inter-observační i intra-observační variabilita (Richardson et al., 2015a).

### **3.2.4 Morfologické charakteristiky a jejich vliv na implantaci**

Individuální morfologické parametry blastocysty byly dále předmětem zkoumání vícera výzkumných skupin, které si daly za cíl zjistit souvislost individuálních parametrů s klinickými úspěchy.

Dle výsledků Richter et al. (2001) je nejdůležitější morfologie ICM. Zjistili, že velikost ICM u implantujících se blastocyst je signifikantně větší než u neimplantujících. Optimální velikost ICM kvalitní blastocysty byla definována větší než  $4500 \mu\text{m}^2$  a velikost ICM u nekvalitní blastocysty jako menší než  $3800 \mu\text{m}^2$ . Důležitou roli také hraje tvar ICM. Kvalitní blastocysta s optimální velikostí a s oválným (optimálním) tvarem ICM měla pravděpodobnost implantace 60%, kdežto blastocysta vykazující pouze optimální velikost měla pravděpodobnost 29% a blastocysta pouze s optimálním tvarem měla 32% (Richter et al., 2001).

Vlivem jednotlivých morfologických parametrů se později zabývali také Van den Abbeel et al. (2013). V jednoduché logistické regresi vyšly všechny tři parametry (expanze blastocoelu, ICM, TE) statisticky významné ( $P < 0,005$ ). Signifikantní zjištění je, že kvalita ICM ( $P = 0,033$ ) byla významně spojená s mírou předčasných potratů. Po převedení blastocysty s ICM stupně A byly hodnoty předčasné ztráty těhotenství přibližně o polovinu menší než po přenosu blastocysty s ICM stupně B nebo C. Po zahrnutí všech tří parametrů do vícenásobné logistické regrese vyšla míra expanze blastocoelu ( $P = 0,002$ ) jako jediný signifikantní prediktor živého porodu. Dle Van den Abbeel et al. (2013) by se měl nejprve zvážit stupeň expanze blastocoelu při výběru

nejkvalitnějšího embrya a pak až další morfologické parametry, viz výše (Van den Abbeel et al., 2013).

Ahlstrom et al. (2011) popsal korelaci mezi expanzí blastocysty s kvalitou buněk TE, které zabraňují úniku kapaliny a iontů sodíku z blastocoelu. Kvalita TE může tedy odrážet schopnost blastocysty účinně čerpat ionty do dutiny. Tím se indukuje osmotická akumulace vody v dutině a výsledkem je lepší expanze blastocoelu (Ahlstrom et al., 2011).

### **3.3 Morfologické hodnocení embryí pomocí Time-lapse**

Time-lapse (časosběrný) monitoring vývoje embrya je neinvazivní metoda sloužící k hodnocení jeho kvality z morfologického a morfokinetického hlediska. Výhodou je kultivace embryí ve standardním prostředí inkubátoru, tudíž za dodržení konstantních *in vitro* podmínek (Kirkegaard et al., 2012). V současné době jsou nejvíce používané systémy Primo Vision a Embryoscope. Oba používají technologii světlého pole (nejstarší metoda optické mikroskopie). Další často používaný systém je EEVA, který naopak využívá technologie tmavého pole, vhodného zvláště pro lepší zvýraznění membrán. Všechny výše zmíněné systémy obsahují inkorporovaný digitální invertovaný mikroskop, který vytváří snímky v předem definovaném čase 5 až 20 minut. Obrazy jsou zpracovány a převedeny do videosekvencí, což umožňuje detailnější analýzu. Systémy se liší maximální kapacitou embryí, které jsou schopny pojmout a způsobem, jakým je monitorují. V embryoscopu se nachází zásobník, který konstantně pohybuje kultivačními destičkami tak, aby se každé jednotlivé embryo dostalo do zorného pole (Kovacs, 2014).

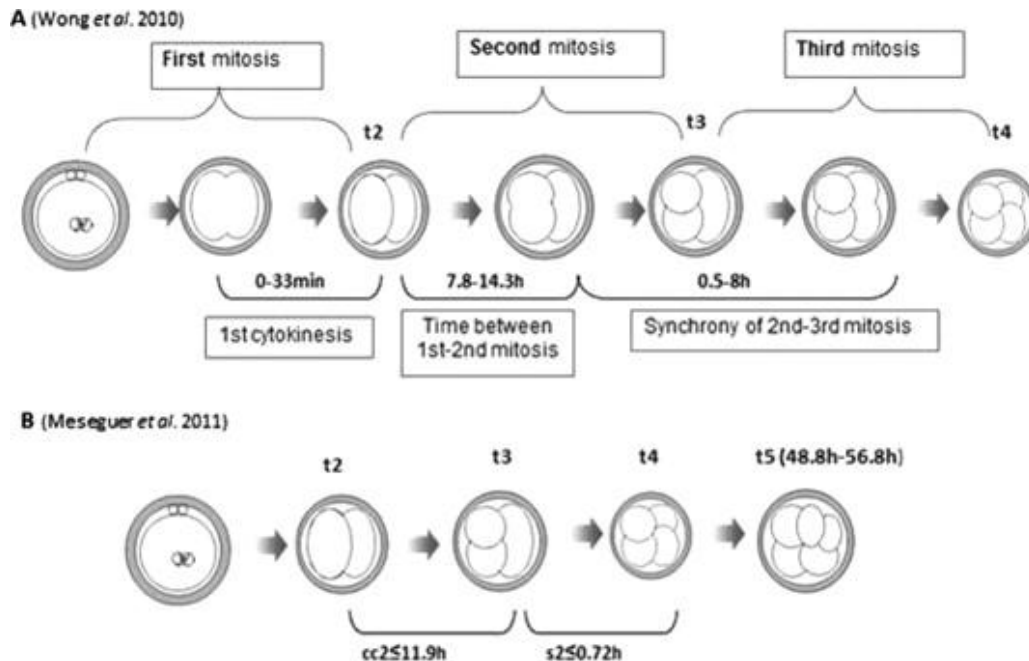
#### **3.3.1 Kinetické parametry**

Potenciální rolí time-lapse v klinickém hodnocení se zabývalo několik nedávných studií. V retrospektivní studii Lemmen et al. (2008) zjistili korelaci mezi časnou ztrátou viditelnosti prvojader a kvalitou buněk ke druhému dni vývoje u dobře se implantujících embryí. Další spojitost našli mezi vyšší úspěšností klinického těhotenství a synchronizovaným znovuobjevením jader v blastomerách po prvním dělení (Lemmen et al., 2008).

Wong et al. (2010) studovali vývojovou kinetiku do stadia blastocysty u zárodků, které byly kryokonzervovány ve stadiu zygoty. Výsledkem výzkumu jsou tři signifikantně prediktivní parametry: (i) doba první cytokineze (průměrný čas  $14.3 \pm 6$  min); (ii) doba mezi první a druhou mitózou (průměrný čas  $11.1 \pm 2.2$  hod.); (iii) doba mezi druhou a třetí mitózou (průměrný čas 1

± 1.6 hod.). Tyto tři parametry byly použity pro vytvoření automatického modelu, schopného předpovědět vznik blastocysty. Žádné z embryí v této studii nebylo transferováno, nelze proto předpovídat schopnost implantace zárodku a klinického těhotenství (Wong et al., 2010).

Na kinetiku vývoje embrya a jeho implantačního potenciálu se zaměřila studie Meseguer et al. (2011). Byla provedena retrospektivní analýza 247 time-lapse embryonálních pozorování, u kterých jsou známé výsledky implantace. Na základě měření postulovali autoři tři hlavní kinetické parametry: (i) doba dělení do stadia 5 buněk,  $t_5$  (48.8-56.8 hodin po ICSI); (ii) doba trvání dělení 3. mitózy,  $s_2$  ( $\leq 0,76$  h) a (iii) doba druhého buněčného cyklu, tzn. čas mezi první a druhou mitózou,  $cc_2$  ( $\leq 11,9$  h). Analýza dat za použití logistické regrese identifikovala jako nejvýznamnější parametr  $t_5$  ze všech výše zmíněných nezávislých proměnných. Vedle toho proběhl výběr dvou kvartilů s nejvyšší frekvencí implantace pro každý parametr, pro  $t_5$  prostřední dva kvartily, pro  $s_2$  a  $cc_2$  první dva kvartily. Velmi krátké dvoubuněčné stadium embrya ( $<5$  hodin), nerovnoměrné blastomery v dvoubuněčném stadiu ( $> 25\%$  rozdíl ve velikosti) a mnohojadernost blastomer ve čtyřbuněčném stadiu jsou defekty spojované s minimální šancí na implantaci a byly autory navrženy jako kritéria pro vyloučení. Výše zmíněné kinetické parametry a kritéria pro vyloučení se staly základem pro vytvoření hierarchického modelu klasifikace embryí (Meseguer et al., 2011). Autoři skupiny Rubio et al. (2014) testovali účinnost tohoto algoritmu v prospektivní randomizované studii s 843 páry postupující ICSI. Výsledkem byl signifikantní nárůst úspěšných těhotenství u embryí vybraných díky algoritmu (51.4%) ve srovnání s embryi hodnocenými dle klasických morfologických systémů (41.7%).



Obr. 2: Grafické srovnání dvou algoritmů a jejich kinetických parametrů určených pro výběr nejkompentnějšího embrya. (A) Algoritmus navržený Wong et al. (2010) zahrnuje dobu trvání první cytokineze, dobu mezi první a druhou mitózou a dobu mezi druhou a třetí mitózou (B) Algoritmus navržený Meseguer et al. (2011) zahrnuje t5: celková doba dělení do stadia 5 buněk, cc2: doba mezi první a druhou mitózou, s2: doba trvání třetí mitózy. Převzato z Aparicio et al. (2013).

### 3.3.2 Bezpečnost time-lapse systémů

Důležitou otázkou je bezpečnost time-lapse analýzy před implementací do klinického prostředí. Při time-lapse monitoringu dochází s větší či menší mírou k periodickému vystavování světlu a akumulaci tepla z pohyblivých částí vybavení (Kirkegaard et al., 2012). Ottosen et al. (2007) porovnali doby expozice ve všech dostupných time-lapse systémech se standardním pozorováním, kdy musí být embrya vyjmuta z inkubátoru a jsou vystavena působení světla v laboratoři. Celkově vyšla doba expozice světla v časosběrných systémech menší než při hodnocení pod elektronovým mikroskopem. Time-lapse systémy by měly minimalizovat expozici embryí krátkým vlnovým délkám, které mohou negativně ovlivnit jejich vývoj. Několik dalších studií potvrdilo závěr, že časosběrný monitoring nepoškozuje kvalitu embrya (Cruz et al., 2011; Kirkegaard et al., 2012).

## **4 Hodnocení kvality embryí pomocí biomarkerů**

Prediktivní možnosti morfologického hodnocení fyziologického stavu embrya jsou značně omezené. Zárodky se stejným morfologickým skóre mohou mít různé metabolické, proteomické a genomické profily. Klíčový je vývoj nových hodnotících metod založených na genomové, transkriptomové, proteomické a metabolické analýze, které jsou neinvazivní a schopné stanovit markery životaschopnosti embrya (Gardner and Wale, 2013). V následující kapitole si přiblížíme hlavně metabolickou a genomickou analýzu.

### **4.1 Metabolismus embrya jako prediktor kvality**

Metabolický obrat je esenciální pro zachování životaschopnosti preimplantačního embrya. Některé nutrienty jsou nezbytné v různých fázích vývoje zárodka. Z tohoto důvodu je studium živin a metabolitů v kultivačním mediu embrya považováno za perspektivní diagnostickou (neinvazivní) techniku.

#### **4.1.1 Metabolismus sacharidů**

V raných stádiích vývoje zárodka je metabolismus založený na aerobní glykolýze a navazujícím Krebsově cyklu. Hlavním zdrojem pro výrobu energie je pyruvát, zatímco spotřeba glukózy je v tomto období zanedbatelná (Botros et al., 2008). Gardner et al. (2001) zkoumali metabolismus pyruvátu ve vztahu k vývoji do stadia blastocysty. Zjistili, že příjem pyruvátu ve 4. den je větší u embryí schopných vývoje do stadia blastocysty ve srovnání s těmi, která se ve vývoji zastavila. Stejný výsledek zaznamenali u metabolismu glukózy, jejíž zvýšená absorpce ve 4. dni také korelovala s úspěšným progresem. Zajímavé je zjištění signifikantně vyššího příjmu glukózy u nejkvalitnějších blastocyst, zatímco množství přijímaného pyruvátu bylo podobné bez ohledu na kvalitu blastocysty. Výsledek tedy prokazuje, že glukóza je podstatnější nutrient pro vývoj embrya (Gardner et al., 2001).

Nárůst příjmu glukózy byl prokázán od stadia moruly až do vývoje v blastocystu. Jeden z hlavních důvodů je aktivace embryonálního genomu, kdy se zvyšuje potřeba energie pro biosyntézu a tvorbu blastocoelu (prostřednictvím aktivity  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPas) (Donnay and Leese, 1999). Gardner and Leese, (1988) poukázali na významně vyšší absorpci glukózy ve 4. dni vývoje u myších embryí, vedoucí k úspěšné implantaci zárodka. Nicméně některé starší studie zabývající se

lidskými embryi nezaznamenaly korelaci mezi příjmem glukózy a vývojem blastocysty (Gott et al., 1990; Hardy et al., 1989). Možným vysvětlením je skutečnost, že ve studiích používali kultivační média s nedostatkem pyruvátu, laktátu a dalších živin, což mohlo vést k metabolickému stresu embryí a k špatné interpretaci výsledků (Seli et al., 2010). Naopak v pozdějším výzkumu, viz výše (Gardner et al., 2001), se projevil významný nárůst glukózy ve 4. den vývoje lidských embryí, která se formovala do stadia blastocysty. Na základě tohoto výsledku a studie metabolismu myších embryí považujeme příjem glukózy za signifikantní marker.

#### **4.1.2 Metabolismus aminokyselin**

Za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie zkoumali Houghton et al. (2002) 18 druhů aminokyselin v různých stádiích vývoje embrya. Prokázali, že embrya formující se do stadia blastocysty mají rozdílný profil metabolismu aminokyselin, než embrya se zastaveným vývojem. Přesněji, menší příjem glutaminu, methioninu, argininu a snížená sekrece aminokyselin alaninu a asparaginu embryi ve druhém až třetím dni vývoje korelovaly s úspěšným vývojem do stadia blastocysty až v 95% (Houghton et al., 2002). V následné studii stejné skupiny Brison et al. (2004) vyšetřovali spojitost mezi metabolismem aminokyselin a úspěšností implantace a klinického těhotenství u embryí, která byla vybrána dle rutinních morfologických parametrů a transferována druhý den. Zjistili korelaci mezi poklesem glycinu a leucinu a nárůstem asparaginu v analyzovaných kultivačních médiích, spojených s úspěšným klinickým těhotenstvím a porodem živého plodu. Podnětný je rozdíl v obratu aminokyselin, předpovídající stadium blastocysty a aminokyselinami anticipujícími klinické těhotenství po transferu. Tento jev odráží skutečnost, že ne všechny blastocystní formy *in vitro* jsou životaschopné (Brison et al., 2004). Obě studie potvrdily hypotézu o tzv. tichém embryu, po kalkulaci obratu aminokyselin. Embrya s větší životaschopností měla nižší obrat aminokyselin v porovnání s těmi, která se ve vývoji zastavila. V novější studii Seli et al. (2008) za použití protonové nukleární magnetické rezonance naměřili významně vyšší koncentrace glutamátu v použitém kultivačním mediu u zárodků, které vedly ke klinickému těhotenství a porodu na rozdíl od těch, jež se nedokázaly implantovat.

Rozdílné technologie použité při měření aminokyselin ale také použití jiných kultivačních medií a rozdílná délka kultivace může vysvětlovat rozdíly v identifikaci aminokyselin jako biomarkerů ve výše zmíněných studiích.

#### **4.1.3 Metabolismus kyslíku**

Jedním ze slibných biomarkerů celkové metabolické aktivity zárodku je spotřeba kyslíku. Většina energie je u preimplantačních embryí uložena ve formě ATP, které je získáváno především oxidativní fosforylací. Množství vyrobené ATP můžeme tedy zjistit díky měření spotřeby kyslíku (Tejera et al., 2012). Funkce mitochondrií je nezbytná pro buněčné přežití a vývoj, proto mitochondriální dysfunkce přispívají ke špatnému vývoji embrya a menšímu počtu těhotenství pozorovaných během IVF cyklů (Dumollard et al., 2007). V několika studiích na savčích embryích se potvrdil nárůst příjmu kyslíku ve stadiu blastocysty v porovnání s ranými stadii vývoje. Důvodem je zvýšená potřeba energie pro tvorbu blastocoelu a syntéza proteinů pro růst embrya (Houghton et al., 1996; Thompson et al., 1996).

Relativní zastoupení živin, ale i koncentrace kyslíku v inkubátoru, ovlivňují metabolismus zárodku. V minulosti se používal atmosférický kyslík pro kultivaci embryí ve většině IVF laboratořích (Gardner and Wale, 2013). Nicméně hladina koncentrace kyslíku v samičích reprodukčních orgánech zdaleka nedosahuje atmosférické úrovně (Bontekoe et al., 2012). Atmosférický kyslík má významný negativní účinek na expresi genů blastocysty, metabolismu a využití sacharidů a aminokyselin. Zlepšení kultivace při koncentraci kyslíku 5% až 7% zaznamenalo několik studií se savčími embryi (Thompson et al., 1990; Batt et al., 1991). Dle studie Kovačič and Vlaisavljević, (2008) má nižší koncentrace kyslíku příznivý vliv na morfologické vlastnosti lidských embryí, který je evidentní již druhý den kultivace. Výsledky studie s 986 oocyty po oplodnění metodou ICSI byly následující: 73.2 % embryí se formovalo do stadia blastocysty v nižších koncentracích kyslíku, 63.1% embryí dosáhlo blastocysty při atmosférickém kyslíku. Signifikantní je procento embryí dosahujících expandované blastocysty s kvalitní ICM v pátý den vývoje, 31.1% při nízké koncentraci versus 14.6% při atmosférické koncentraci kyslíku (Kovačič and Vlaisavljević, 2008)

## **4.2 Analýza sekretomu**

Většina metabolitů produkovaná embryem jsou peptidové řetězce netvořící funkční proteiny. Skupinu sekretovaných proteinů a dalších komponentů v kultivačním mediu nazýváme sekretom. Dle Katz-Jaffe et al. (2006) mají životaschopná embrya jedinečný proteom a následně některé z proteinů vylučují do média v rámci sekretomu. V roce 2009 navrhli Katz-Jaffe et al. potenciální biomarkery v sekretomu zahrnující leptin, agrokranin, faktor aktivující destičky (PAF), lidský leukocytární antigen (HLA-G) a ubiquitin. Několik výzkumných skupin se zabývalo využitelností HLA-G jako biomarkeru při hodnocení kvality embryí, jelikož je lidský leukocytární antigen nesmírně důležitý v imunologické toleranci mezi matčinou imunitou a plodem. Ve své studii Fuzzi et al. (2002) detekovali přítomnost rozpustného HLA-G v kultivačním mediu metodou ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Výsledkem studie byl nález pozitivní korelace mezi přítomností HLA-G a implantačním potenciálem embrya. Navzdory slibným výsledkům zkoumání dalších skupin se měření leukocytárního antigenu-G nepoužívá v klinické praxi (Fuzzi et al., 2002; Sher et al., 2004).

Jedním z dalších zkoumaných biomarkerů v sekretomu je leptin. Jedná se o malý pleiotropní protein, který byl také pozorován v kultivačním mediu blastocyst. Metodou ELISA byla prokázána spojitost mezi vylučováním vyšších koncentrací leptinu do media u kompetentních blastocyst (González et al., 2000). Dle Cervero et al. (2005) existuje cross-talk mezi sekretovaným leptinem blastocystou a endometriem matky, které exprimuje leptinové receptory během luteální fáze. Byla navržena hypotéza o aktivaci leptinových receptorů sekretovaným leptinem, což usnadňuje proces implantace embrya (Cervero et al., 2005).

## **4.3 Genomické hodnocení kvality embryí**

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) je alternativou k prenatalní diagnostice umožňující detekci genetických onemocnění IVF embryí před jejich přenosem do dělohy. Cílem tohoto postupu je vybrat embryo nezatížené genetickou poruchou u dvojic s rizikem přenosu těžkých genetických poruch na jejich potomstvo. Výsledkem je dosažení zdravého těhotenství a v některých případech vymazání dědičné nemoci z rodinné anamnézy (Fragouli, 2007). V současné době používáme PGD k diagnostice více než 200 nemocí např. cystické fibrózy, Tayova-Sachsova choroby, hemofilie, Huntingtonova choroby, srpkovité anémie, syndromu fragilního X

a několika druhů dědičných rakovin jako je retinoblaston a rakovina prsu s mutací v genu BRCA1/BRCA2 (Girardet et al., 2003; Menon et al., 2007). Technika preimplantační genetické diagnostiky se v současné době rozšířila na preimplantační genetický screening (PGS), což je metoda využívaná pro stanovení přítomnosti aneuploidie (nadpočetný nebo chybějící jeden, či více chromozomů) ve vyvíjejícím se embryu (Brezina et al., 2013)

Pouze 5% až 30% embryí, která přežijí transfer do dělohy, vyústí v úspěšné těhotenství a narození dítěte. Existuje mnoho negativních faktorů ovlivňujících přežití embrya, jedním z nejdůležitějších je chromozomální abnormalita. Cytogenetické analýzy prokázaly, že více než polovina všech lidských preimplantačních embryí obsahuje aneuploidní buňky (Munné et al., 1993; Harper et al., 1995; Delhanty et al., 1997).

Indikace u pacientů k PGD/PGS jsou následující:

- Jsou přenašeči monogenního onemocnění (mutace v jednom genu), Autozomálně dominantní či recesivní nebo vázané na chromozom X;
- Jsou nosiči chromozomální abnormalit, reciproční a Robertsonská translokace, inverze, delece, inzerce atd.;
- Vyšší věk partnerky (více než 35 let), u starších žen je větší incidence aneuploidie chromozomů 13, 16, 18 a 21 (Voullaire et al., 2007);
- Opakované neúspěchy IVF léčby;
- Nevysvětlitelné opakované potraty;

#### **4.3.1 Biopsie**

Provedení PGD zahrnuje tři fáze: proces IVF, biopsii materiálu ze zárodku a v poslední řadě diagnózu odebraných buněk. Biopsii je možné provést ve třech fázích vývoje: odebrání prvního nebo druhého polárního tělíska (PB) extrudovaného z oocytů během meiózy, vyjmutí blastomery ve fázi rýhování (většinou 3. den) a odebrání části TE z blastocysty (Hameed and Ali, 2008).

#### **4.3.1.1 Biopsie pólového tělíska**

Zralý oocyt se vyznačuje přítomností prvního PB, které obsahuje 23 mateřských chromozómů. Tato struktura může být odstraněna a použita pro genetické testování nebo aneuploidní screening oocytů před oplodněním. Po fertilizaci se může použít i druhé PB pro zlepšení přesnosti diagnózy (Rechitsky et al., 1999). Nevýhodou této metody je, že poskytuje informace o genotypu matky a případné defekty z otcovy strany nejsou touto metodou zjistitelné. Pozitivem je jednoduché odebrání vzorků bez možného ovlivnění vývoje zárodka. V některých zemích se používá také z etických důvodů.

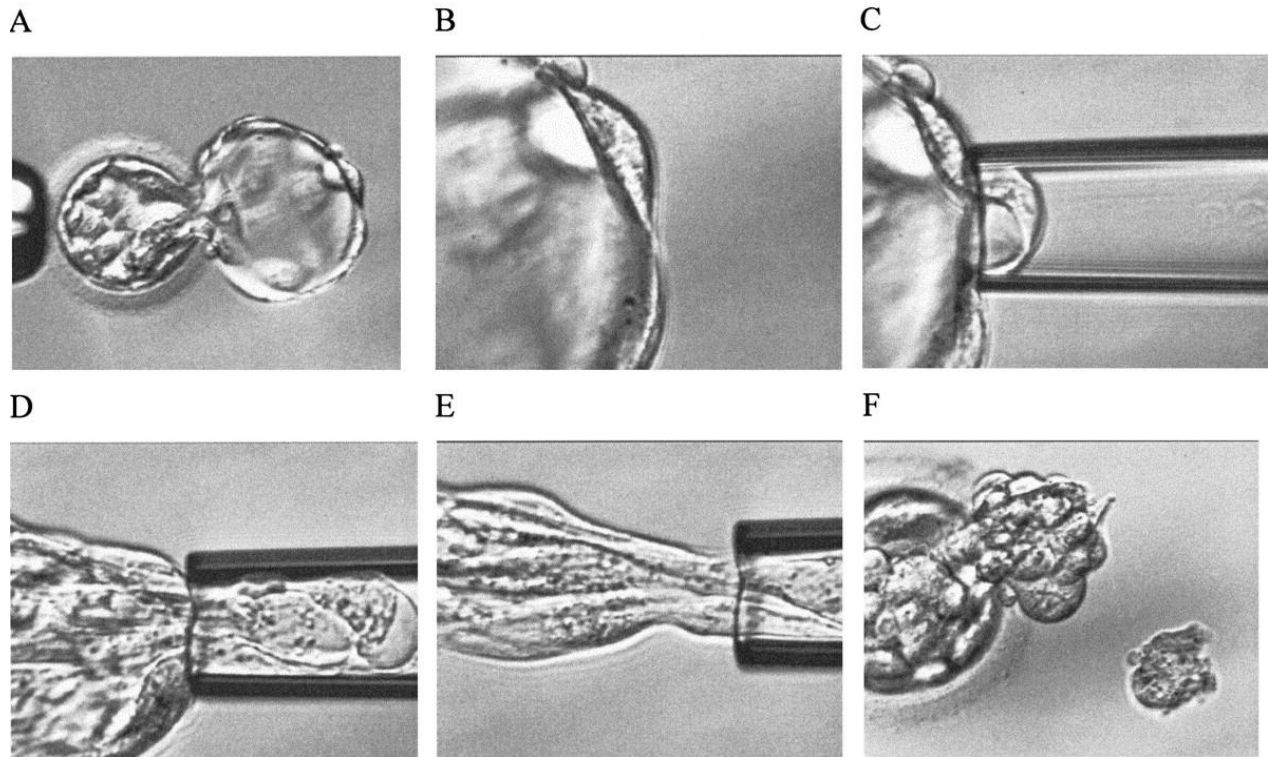
#### **4.3.1.2 Biopsie blastomery ve fázi rýhování**

Biopsie ve fázi rýhování je široce používanou technikou v IVF centrech. ZP se naruší za použití kyselého Tyrodova roztoku nebo mechanicky laserovou technologií a následně jsou jemně nasávány biopickou mikropipetou jedna či dvě blastomery. Alternativou je vytvoření malého otvoru v ZP a následné nasátí buněk, tato technika se ale u dělicích se embryí široce nevyužívá (De Vos and Van Steirteghem, 2001). Kontroverzní otázkou je rozhodnutí, zdali je vhodné odebrání dvou blastomer. Odebrání více buněk snižuje hmotnost embrya a může ovlivnit jeho vývojovou kapacitu. Na druhou stranu přesnost diagnózy se zvyšuje evidencí výsledků z obou blastomer vzhledem k vysoké míře výskytu mozaicismu embryí. Ve své studii Van de Velde et al. (2000) hodnotili implantaci po odstranění jedné, dvou či tří buněk. Prokázali nesignifikantní rozdíl v implantaci embryí, kterým byly odebrány jedna nebo dvě buňky. Proto doporučují analyzovat dvě blastomery u embrya s víc jak sedmi buňkami pro přesnější a spolehlivější diagnostiku.

#### **4.3.1.3 Biopsie trofoblastu blastocysty**

Hlavním problémem biopsií ve dřívějším stadiu vývoje je nedostatek materiálu. Biopsie blastocysty tento problém odstraňuje, jelikož může obsahovat až 300 buněk a není zátěží odebrat více buněk (Braude et al., 2002). Biopsie se obvykle provádí 5. nebo 6. den od oplodnění a zahrnuje narušení ZP, nasátí několika buněk TE a následné oddělení laserem (viz obr. 1) (McArthur et al., 2005). Jako nevýhodu odběru materiálu v této fázi vývoje můžeme vnímat fakt, že jen malé množství embryí se vyvine do stadia blastocysty a je tak relativně málo času pro genetické testování před transferem embrya.

Kryokonverzace geneticky testovaných blastocyst a přenesení až v dalším cyklu je tedy nezbytné (Seli et al., 2008). Přesto je v současnosti více praktikovanou technikou v IVF centrech než odběr blastomer ve fázi rýhování.



Obr. 3: Biopsie trofoblastu blastocysty ve stavu hatchingu. (A) Expandující blastocysta v 5. den vývoje. (B) Detail trofoblastu. (C) Začátek biopsie mikropipetou. (D) Nasátí buněk trofoektodermu do pipety. (E) Oddělení buněk laserem (nezobrazen). (F) Blastocysta po biopsii a 2- až 9- buněčný vzorek. Převzato z McArthur et al. (2005).

## 4.3.2 Analytické metody

### 4.3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je technika založená na rychlém zmnožení určitého úseku DNA do té míry, že se může podrobit genetické diagnostice. PCR se v PGD používá k detekci monogenních chorob. Celý postup nejprve začínáme denaturací odebrané buňky ve speciálním roztoku. Následně k uvolněné DNA přidáme speciální PCR mix s primery a PCR reakce může

začít. Kvůli vysoké citlivosti této metody hrozí nebezpečí kontaminace cizí DNA, proto jsou v laboratořích zavedena přísná opatření (Sermon et al., 2004). Častá je amplifikace jen jedné alely z obou přítomných v heterozygotním locusu, což může vést k falešnému předpokladu, že vzorek byl homozygotní a pozdější špatné diagnostice. Aby se předešlo tomuto problému tzv. allele-drop out (ADO), bylo vyvinuto několik technik zlepšujících PCR analýzu: fluorescenční PCR a později multiplexní PCR (Rechitsky et al., 1998).

#### **4.3.2.2 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**

FISH je standardní cytogenetickou metodou užívanou pro aneuploidní screening a detekci chromozomálních translokací (reciproké a Robertsonovy). FISH se používá pro testování omezeného počtu chromozomů (13, 16, 18, 21, X a Y) nesoucí časté chromozomální abnormality (Voullaire et al., 2007). Postup se skládá z následujících kroků: fixování jader odebraných buněk na mikroskopické podložní sklíčko, denaturace DNA, nanesení DNA sond (označené fluorochromem) specifických pro sledované chromozomy, ochlazení a hybridizace sond na rozeznaném úseku. Po několika omytích přebytečných sond můžeme pozorovat hybridizační signály ve fluorescenčním mikroskopu (Sermon et al., 2004). Dalším využitím FISH metody je stanovení pohlaví embrya. V rodinách s recesivní X vázanou dědičností se preferuje výběr ženského embrya raději než mužského. Důvodem je až 50% pravděpodobnost narození nemocného chlapce na rozdíl od dívek, které jsou hlavně přenašečky (Staessen et al., 1999). Mezi problémy spojenými s metodou FISH patří překryv nebo naopak rozštěpení signálu, selhání hybridizace, anomální fluorescence a nedostatek speciálních sond s nezbytným fluorochromem (Munné et al., 1998).

#### **4.3.2.3 Komparativní genomová hybridizace (CGH, aCGH)**

Komparativní genomová hybridizace umožňuje screening celého genomu. CGH detekuje kvantitativní změny v genomu, tj. nebalancované genetické přestavby (Voullaire et al., 2000). Hlavním principem je porovnávání genomu testovaného a referenčního vzorku. Předem amplifikovaná testovaná DNA (neznámého karyotypu) je označena zeleným fluorochromem. Referenční vzorek normálního karyotypu je také amplifikován a označen červeným fluorochromem. Poté jsou oba vzorky smíchány a ko-hybridizovány s normálními chromozomy v metafázi. Testovací a referenční DNA kompetuje o hybridizační místo na každém z 23

chromozomů. V případě, že testovaná DNA je karyotypicky normální, není pozorován žádný rozdíl v intenzitě fluorescence oproti oblastem vykazujících zelenou fluorescenci, což značí více genetického materiálu v testovaném genomu (tzn. duplikace). Červená barva poukazuje na delece v genomu zkoumaného vzorku (Sermon et al., 2004). Nevýhodou CGH je, že celý postup trvá 72 hod. Z tohoto důvodu aplikujeme metodu na pólová tělíška, kde na analýzu máme 5 dní. Metodu CGH můžeme použít i pro odebrané blastomery ve fázi rýhování, poté se ale musí embrya krykonverzovat a použít v dalším cyklu. Použitím této metody se podařilo dosáhnout několik úspěšných těhotenství a porodů (Wilton et al., 2001, 2003). Nadějí na zjednodušení a zrychlení CGH je použití mikročipů. Stejně jako CGH zahrnuje aCGH komparativní genomovou hybridizaci testovaných a referenčních vzorků DNA. Hybridizace DNA probíhá na DNA sondách připojených na mikroskopické sklíčko narozdíl od normalní CGH, která probíhá na chromozómech v metafázi. Celý proces aCGH trvá přibližně 48 hodin, není proto nutné dělit se embrya po analýze krykonverzovat (Wells et al., 2008).

Nejnovější pokrok v sekvenování celého genomu je vývoj metody next generation sequencing (NGS). V porovnání s aCGH má metoda NGS větší rozlišení a poskytuje více informací o stavu chromozomů, jelikož získává data z tisíců míst na chromozomu principem paralérního sekvenování. Výhodou přesnosti analýzy je možnost odhalení mozaicismu u embryí, která byla prohlášena za kvalitní (Fiorentino et al., 2014). NGS umožňuje detekovat genové mutace a translokace současně ze stejné biopsie, což nám snižuje celkové náklady spojené s PGS a PGD (Treff et al., 2013; Yin et al., 2013). Metoda se tak stává přístupná pro více pacientů postupující léčbu IVF.

## 5 Závěr

Práce poskytuje souhrn a porovnání vybraných metod vyvinutých pro evaluaci embryí. Ve své práci jsem popsala základní parametry sledovaných metod, jejich praktickou využitelnost, výhody a nevýhody.

Hodnocení na základě morfologických parametrů je stále nenahraditelná metoda pro evaluaci zárodků. Většina embryologů spoléhá na zavedený konvenční systém morfologického hodnocení, který navzdory své nepřesnosti nese určitou prediktivní sílu. Posun v morfologické evaluaci přinesl vývoj time-lapse monitoringu, který umožnil sledovat dynamický proces vývoje embrya. Výsledky randomizované studie modelu založeného na kinetických parametrech prokázaly větší účinnost morfokinetického hodnocení nad statickým morfologickým systémem hodnocení. Avšak limitem zůstává nákladnost vybavení. Dle mého názoru je systém beroucí v úvahu jak morfolologii, tak kinetiku nejlepším současným přístupem v selekci embryí. Usuzuji takto na základě množství studií o bezpečnosti a praktičnosti metody pro klinické použití.

Slibnou neinvazivní metodou zkoumající biomarkery vitality je měření obratu metabolitů v kultivačním mediu. Poskytuje bezprostřední náhled na všechny biologické pochody odrážející aktuální vývoj zárodku na rozdíl od genomiky a proteomiky, které poskytují informace o očekávané funkci. Hlavním omezením zůstává metabolická plasticita embrya, tj. adaptabilita vůči kultivačním podmínkám. Z toho důvodu je standardizace kultivačních medií nezbytná pro další vývoj těchto metod. Troufám si tvrdit, že po vytvoření robustního modelu a několika randomizovaných studií má metoda měření obratu metabolismu velký potenciál být významným doplňkem ke konvenčnímu morfologickému hodnocení.

Pro posouzení vývojové kompetence zárodků je použitelná preimplantační genetická diagnostika, pomocí které se detekují mutace a aneuploidie. PGD neaplikujeme plošně na všechna embrya, ale pouze na embrya pacientů s rizikovou diagnózou nebo pacientů s opakovaným selháváním IVF léčby. Ve výsledném dopadu je benefitem této metody vyhnutí se psychické zátěži z umělého přerušení těhotenství. Nicméně metody PGD zahrnují invazivní biopsii, která je časově náročná a může představovat určité riziko pro embryo a v neposlední řadě je nákladná. V případě této metody pokládám za zřejmé, že využití PGD spočívá především

v komplementaritě morfologických metod. Je nutné zmínit probíhající rychlý vývoj metod genetické diagnostiky s vysokou přesností identifikace vývojově kompetentního embrya (NGS).

Na základě této práce jsem došla ke zjištění, že komparace stávajících morfologických a nových metod sledujících biomarkery životaschopnosti embryí je v mnoha ohledech diskutabilní. Jak zmiňuji výše, je to především odlišnost použití a zacílení sledovaných metod. Dále srovnávání relativizuje rozdílnost znalostí spočívající v deficitu dat z velkých randomizovaných studií a z klinické praxe. Stávající dynamika výzkumu umožňuje předpoklad komperability nových a starých metod v řádech několika let.

Z mého pohledu je jediné skutečně komparativní kritérium principiální rozdíl mezi popisovanými metodami. V případě morfologických metod to je princip hodnocení na základě subjektivního posouzení kvalitativních znaků oproti empirickému měření biomarkerů embryí.

Díky této bakalářské práci jsem získala řadu nových poznatků, které chci prohlubovat a rozvíjet ve své diplomové práci.

## 6 Seznam literatury

- Ahlstrom, A., Westin, C., Reismer, E., Wikland, M., Hardarson, T., 2011. Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum. Reprod.* 26, 3289–3296.
- Alikani, M., 2005. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 3369–3375.
- Alikani, M., Cohen, J., Tomkin, G., Garrisi, G.J., Mack, C., Scott, R.T., 1999. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil. Steril.* 71, 836–842.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, Balaban, B., Brison, D., Calderon, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., Ebner, T., Gardner, D., Hardarson, T., Lundin, K., Cristina Magli, M., Mortimer, D., Mortimer, S., Munne, S., Royere, D., Scott, L., Smitz, J., Thornhill, A., van Blerkom, J., Van den Abbeel, E., 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum. Reprod.* 26, 1270–1283.
- \*Aparicio, B., Cruz, M., Meseguer, M., 2013. Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod. Biomed. Online* 27, 654–663.
- Balaban, B., Urman, B., Sertac, A., Alatas, C., Aksoy, S., Mercan, R., 2000. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil. Steril.* 74, 282–287.
- Balaban, B., Yakin, K., Urman, B., 2006. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertil. Steril.* 85, 559–563.
- Balakier, H., Cadesky, K., 1997. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12, 800–804.
- Batt, P.A., Gardner, D.K., Cameron, A.W., 1991. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 601–607.
- Bontekoe, S., Mantikou, E., van Wely, M., Seshadri, S., Repping, S., Mastenbroek, S., 2012. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008950.

- Botros, L., Sakkas, D., Seli, E., 2008. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 679–690.
- Braude, P., Bolton, V., Moore, S., 1988. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332, 459–461.
- \*Braude, P., Pickering, S., Flinter, F., Ogilvie, C.M., 2002. Preimplantation genetic diagnosis. *Nat. Rev. Genet.* 3, 941–955.
- \*Brezina, P.R., Ke, R.W., Kutteh, W.H., 2013. Preimplantation Genetic Screening: A Practical Guide. *Clin. Med. Insights Reprod. Health* 7, 37–42.
- Brison, D.R., Houghton, F.D., Falconer, D., Roberts, S.A., Hawkhead, J., Humpherson, P.G., Lieberman, B.A., Leese, H.J., 2004. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum. Reprod.* 19, 2319–2324.
- Cervero, A., Horcajadas, J., Domínguez, F., Pellicer, A., Simón, C., 2005. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod. Biomed. Online* 10, 217–223.
- Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K.S., Martínez, M., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., Meseguer, M., 2011. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 569–573.
- \*De Vos, A., Van Steirteghem, A., 2001. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 21, 767–780.
- Desai, N.N., Goldstein, J., Rowland, D.Y., Goldfarb, J.M., 2000. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 15, 2190–2196.
- Dokras, A., Sargent, I.L., Barlow, D.H., 1993. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 8, 2119–2127.
- Donnay, I., Leese, H.J., 1999. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 171–178.
- Dumollard, R., Duchen, M., Carroll, J., 2007. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 77, 21–49.

- Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Pölz, W., Tews, G., 2001. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* 76, 281–285.
- Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C.-E., Minasi, M.G., Greco, E., 2014. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum. Reprod.* 29, 2802–2813.
- \*Fragouli, E., 2007. Preimplantation genetic diagnosis: present and future. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 201–207.
- Fuzzi, B., Rizzo, R., Criscuoli, L., Noci, I., Melchiorri, L., Scarselli, B., Bencini, E., Menicucci, A., Baricordi, O.R., 2002. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur. J. Immunol.* 32, 311–315.
- Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schoolcraft, W.B., 2001. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil. Steril.* 76,
- Gardner, D.K., Leese, H.J., 1988. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* 104, 423–429.
- Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., 1999a. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 11, 307–311.
- Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., 1999b. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 11, 307–311.
- Gardner, D.K., Wale, P.L., 2013. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil. Steril.* 99, 1062–1072.
- Girardet, A., Hamamah, S., Anahory, T., Déchaud, H., Sarda, P., Hédon, B., Demaille, J., Claustres, M., 2003. First preimplantation genetic diagnosis of hereditary retinoblastoma using informative microsatellite markers. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 111–116.
- González, R.R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A., Simon, C., 2000. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4883–4888.

- Gott, A.L., Hardy, K., Winston, R.M., Leese, H.J., 1990. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 5, 104–108.
- \*Hameed, N., Ali, M.A., 2008. PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 20.
- Hardarson, T., 2006. Zygotes cleaving directly into more than two cells after 25–27 h in culture are predominantly chromosomally abnormal.
- Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., Lundin, K., 2001. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 16, 313–318.
- Hardy, K., Hooper, M.A., Handyside, A.H., Rutherford, A.J., Winston, R.M., Leese, H.J., 1989. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 4, 188–191.
- Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Humpherson, P.G., Hogg, J.E., Balen, A.H., Rutherford, A.J., Leese, H.J., 2002. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 999–1005.
- Houghton, F.D., Thompson, J.G., Kennedy, C.J., Leese, H.J., 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 476–485.
- Katz-Jaffe, M.G., McReynolds, S., Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., 2009. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 271–277.
- \*Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., Ingerslev, H.J., 2012. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum. Reprod.* 27, 1277–1285.
- \*Kovačič, B., Vlaisavljević, V., 2012. Importance of blastocyst morphology in selection for transfer, in: *Advances in Embryo Transfer*. InTech.
- Kovačič, B., Vlaisavljević, V., 2008. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 17, 229–236.

- Kovacic, B., Vlaisavljevic, V., Reljic, M., Cizek-Sajko, M., 2004. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod. Biomed. Online* 8, 687–694.
- Kovacs, P., 2014. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 124.
- Lemmen, J.G., Agerholm, I., Ziebe, S., 2008. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 17, 385–391.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., 2001. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183, S29–S34.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A., Farfalli, V., 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* 87, 534–541.
- McArthur, S.J., Leigh, D., Marshall, J.T., de Boer, K.A., Jansen, R.P.S., 2005. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil. Steril.* 84, 1628–1636.
- Menon, U., Harper, J., Sharma, A., Fraser, L., Burnell, M., ElMasry, K., Rodeck, C., Jacobs, I., 2007. Views of BRCA gene mutation carriers on preimplantation genetic diagnosis as a reproductive option for hereditary breast and ovarian cancer. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 1573–1577.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K.M., Ramsing, N.B., Remohi, J., 2011. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26, 2658–2671.
- Munné, S., Márquez, C., Magli, C., Morton, P., Morrison, L., 1998. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 863–870.
- Ottosen, L.D.M., Hindkjær, J., Ingerslev, J., 2007. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 99–103.
- \*Prados, F.J., Debrock, S., Lemmen, J.G., Agerholm, I., 2012. The cleavage stage embryo. *Hum. Reprod.* 27, i50–i71.

- Racowsky, C., Stern, J.E., Gibbons, W.E., Behr, B., Pomeroy, K.O., Biggers, J.D., 2011. National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. *Fertil. Steril.* 95, 1985–1989.
- Rechitsky, S., Strom, C., Verlinsky, O., Amet, T., Ivakhnenko, V., Kukhareno, V., Kuliev, A., Verlinsky, Y., 1999. Accuracy of preimplantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16, 192–198.
- Rechitsky, S., Strom, C., Verlinsky, O., Amet, T., Ivakhnenko, V., Kukhareno, V., Kuliev, A., Verlinsky, Y., 1998. Allele Dropout in Polar Bodies and Blastomeres. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 253–257.
- Richardson, A., Brearley, S., Ahitan, S., Chamberlain, S., Davey, T., Zujovic, L., Hopkisson, J., Campbell, B., Raine-Fenning, N., 2015a. A clinically useful simplified blastocyst grading system. *Reprod. Biomed. Online* 31, 523–530.
- Richardson, A., Brearley, S., Ahitan, S., Chamberlain, S., Davey, T., Zujovic, L., Hopkisson, J., Campbell, B., Raine-Fenning, N., 2015b. A clinically useful simplified blastocyst grading system. *Reprod. Biomed. Online* 31, 523–530.
- Richter, K.S., Harris, D.C., Daneshmand, S.T., Shapiro, B.S., 2001. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil. Steril.* 76, 1157–1167.
- Royen, E.V., 2003. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum. Reprod.* 18, 1062–1069.
- Rubio, I., Galán, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herrero, J., Meseguer, M., 2014. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil. Steril.* 102, 1287–1294.e5.
- \*Sadler, T.W., 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada, Praha.
- Seli, E., Botros, L., Sakkas, D., Burns, D.H., 2008. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 90, 2183–2189.

- \*Seli, E., Robert, C., Sirard, M.-A., 2010. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 513–530.
- \*Sermon, K., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 2004. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet Lond. Engl.* 363, 1633–1641.
- Sher, G., Keskinetepe, L., Nouriani, M., Rousev, R., Batzofin, J., 2004. Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of ‘embryo competency’ and IVF outcome. *Reprod. Biomed. Online* 9, 74–78.
- Shoukir, Y., Campana, A., Farley, T., Sakkas, D., 1997. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12, 1531–1536.
- Skiadas, C.C., Jackson, K.V., Racowsky, C., 2006. Early compaction on day 3 may be associated with increased implantation potential. *Fertil. Steril.* 86, 1386–1391.
- Staessen, C., Van Assche, E., Joris, H., Bonduelle, M., Vandervorst, M., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., 1999. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 382–389.
- Staessen, C., Van Steirteghem, A., 1998. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 13, 1625–1631.
- Tao, J., Tamis, R., Fink, K., Williams, B., Nelson-White, T., Craig, R., 2002. The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 1513–8.
- Tejera, A., Herrero, J., Vilorio, T., Romero, J.L., Gamiz, P., Meseguer, M., 2012. Time-dependent O<sub>2</sub> consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil. Steril.* 98, 849–857.e3.
- Thompson, J.G., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Cox, C.I., Leese, H.J., 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 106, 299–306.
- Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E., Tervit, H.R., 1990. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 89, 573–578.

- Treff, N.R., Fedick, A., Tao, X., Devkota, B., Taylor, D., Scott, R.T., 2013. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil. Steril.* 99, 1377–1384.e6.
- \*Vacek, Z., 2006. *Embryologie*. Grada, Praha.
- Van de Velde, H., De Vos, A., Sermon, K., Staessen, C., De Rycke, M., Van Assche, E., Lissens, W., Vandervorst, M., Van Ranst, H., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., 2000. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 20, 1030–1037.
- Van den Abbeel, E., Balaban, B., Ziebe, S., Lundin, K., Cuesta, M.J.G., Klein, B.M., Helmggaard, L., Arce, J.-C., 2013. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reprod. Biomed. Online* 27, 353–361.
- Voullaire, L., Collins, V., Callaghan, T., McBain, J., Williamson, R., Wilton, L., 2007. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil. Steril.* 87, 1053–1058.
- Voullaire, L., Slater, H., Williamson, R., Wilton, L., 2000. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum. Genet.* 106, 210–217.
- Wells, D., Alfarawati, S., Fragouli, E., 2008. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 703–710.
- Wilton, L., Voullaire, L., Sargeant, P., Williamson, R., McBain, J., 2003. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil. Steril.* 80, 860–868.
- Wilton, L., Williamson, R., McBain, J., Edgar, D., Voullaire, L., 2001. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N. Engl. J. Med.* 345, 1537–1541.
- Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., Pera, R.A.R., 2010. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28, 1115–1121.

Yin, X., Tan, K., Vajta, G., Jiang, H., Tan, Y., Zhang, C., Chen, F., Chen, S., Zhang, C., Pan, X., Gong, C., Li, X., Lin, C., Gao, Y., Liang, Y., Yi, X., Mu, F., Zhao, L., Peng, H., Xiong, B., Zhang, S., Cheng, D., Lu, G., Zhang, X., Lin, G., Wang, W., 2013. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. Biol. Reprod. 88, 69.

**Sekundární citace: \***