

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických vied

Diagnostický potenciál piwi-RNA molekúl v procese *in vitro* fertilizácie

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: doc. RNDr. Lenka Skálová, PhD.

Konzultant diplomovej práce: doc. RNDr. Miroslava Rabajdová, PhD.

Hradec Králové 2023

Bc. Dominika Šeršeň, DiS.

PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného než rovnakého titulu.“

Košice, 5.05.2023

.....

podpis

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Bc. Dominika Šeršeň, DiS.

Školiteľ: doc. RNDr. Lenka Skálová, PhD.

Konzultant: doc. RNDr. Miroslava Rabajdová, PhD.

Názov diplomovej práce: Diagnostický potenciál piwiRNA molekúl v IVF procese

Neplodnosť je v súčasnej dobe veľkým zdravotným problémom, ktorý postihuje milióny párov v reprodukčnom veku na celom svete a využitie techník *in vitro* oplodnenia sa celosvetovo každoročne zvyšuje. Pre úspešné *in vitro* oplodnenie je nevyhnutné vybrať kvalitné embryo. Napriek pokrokom pri *in vitro* fertilizácii je stále nedostatočné množstvo neinvazívnych a spoľahlivých biomarkerov na selekciu embryí s najvyšším vývojovým a implantačným potenciálom. Ako vhodný biomarker sa ukazujú malé nekódujúce RNA, konkrétne piwiRNA (piRNA) a mikroRNA (miRNA), secernované do extracelulárneho prostredia, ktorým je kultivačné médium.

Táto práca popisuje hodnotenie kvality embryí, ich morfológické znaky v jednotlivé dni ako aj samotný anotačný systém pomocou TimeLapse systému. V ďalších kapitolách je popísané zloženie médií, ktoré sú vhodné ku kultivácii embryí, a ich analýza na omickej úrovni so zameraním na piRNA a miRNA.

Hlavným cieľom tejto práce je preukázať diagnostický potenciál malých nekodujúcich RNA molekúl v *in vitro* fertilizácii, pomocou ktorých by bolo možné neinvazívne vybrať kompetentné embryo k embryotransferu v procese IVF.

V experimentálnej časti bola preukázaná zvýšená expresia piRNA molekúl - hsa_piR_28263, hsa_piR_18682, hsa_piR_23020, hsa_piR_414, hsa_piR_27485 do kultivačného média, ktoré súviseli s implantačnou schopnosťou embrya a ich prítomnosť bola spojená s úspešnými embryotransfermi. Súčasne bola pomocou umelej inteligencie preukázaná zvýšená expresia miRNA molekúl - hsa-miR7-5p, ktoré súviseli s vysokou kvalitou embrya

a následným úspešným embryotransferom. Krátke nekódujúce RNA molekuly – piRNA a miRNA by mohli predstavovať vhodný biomarker pre hodnotenie kvality a viability embrya, za účelom zvýšenia počtu úspešných tehotenstiev.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Dominika Šeršeň, DiS.

Supervisor: doc. RNDr. Lenka Skálová, PhD.

Consultant: doc. RNDr. Miroslava Rabajdová, PhD.

Title of diploma thesis: The diagnostic potential of piwiRNA molecules in IVF procedure

Infertility is currently a prevalent health problem affecting millions of couples of reproductive age worldwide and the use of in vitro fertilization techniques is increasing worldwide every year.

For successful in vitro fertilization, it is essential to select a good quality embryo. Despite advances in in vitro fertilization, there is still an insufficient amount of non-invasive and reliable biomarkers for the selection of embryos with the highest developmental and implantation potential. Small non-coding RNAs, specifically piwiRNAs (piRNAs) and microRNAs (miRNAs), secreted into the extracellular environment, which is the culture medium, appear to be suitable biomarkers.

This work describes the evaluation of the quality of the embryos, their morphological features on individual days as well as the annotation system itself using the TimeLapse system. The next chapter describes the composition of the media suitable for the cultivation of embryos and their analysis at the omic level, focusing on piRNAs and miRNAs. In the next chapters, the composition of the media suitable for the cultivation of embryos and their analysis at the omic level is described. The work is focused on small non-coding RNAs – piRNAs and miRNAs, which are secreted into the culture medium, and are characterized in the following chapters together with selected molecular methods for the detection of sncRNAs.

The main goal of this work is to demonstrate the diagnostic potential of small non-coding RNA molecules in in vitro fertilization, which could be used to non-invasive selection of a competent embryo suitable for embryo transfer in in vitro fertilisation.

In the experimental part, an increased expression of piRNA molecules - hsa_piR_28263, hsa_piR_18682, hsa_piR_23020, hsa_piR_414, hsa_piR_27485 was demonstrated in the culture medium, which were related to the implantation ability of the embryo and their presence was associated with successful embryo transfers. At the same time, the artificial intelligence, an increased expression of miRNA molecules - hsa-miR7-5p - was demonstrated, which were related to high embryo quality and subsequent successful embryo transfer. Short non-coding RNA molecules - piRNAs and miRNAs could represent a suitable biomarker for evaluating the quality and viability of the embryo, in order to increase the number of successful pregnancies.

Obsah

1	Úvod	11
2	Súčasný stav riešenej problematiky	12
2.1	Neplodnosť	12
2.1.1	Gynekologické faktory neplodnosti	12
2.1.2	Andrologické faktory neplodnosti.....	13
2.1.3	Hormonálne príčiny neplodnosti.....	13
2.1.4	Imunologické príčiny neplodnosti.....	14
2.1.5	Genetické faktory neplodnosti	14
2.1.6	Hematologické príčiny neplodnosti	15
2.1.7	Idiopatická neplodnosť	15
2.2	Biochemický cyklus preimplantačného embrya	17
2.2.1	Inseminácia oocyту.....	17
2.2.2	Blastogenéza	17
2.2.2.1	Morula.....	18
2.2.2.2	Blastocysta	18
2.3	Genetické formovanie embrya v jednotlivých dňoch.....	19
2.3.1	Prechod z meiózy do mitózy.....	19
2.3.2	Aktivácia embryonálneho genómu.....	20
2.3.3	Implantácia embrya	20
2.3.3.1	Apozícia	20
2.3.3.2	Adhézia	21
2.3.3.3	Invázia.....	21
2.3.3.4	Implantačné okno	21
2.4	Hodnotenie kvality embryí	23
2.4.1	Hodnotenie kvality pronukleárneho štádia	23
2.4.2	Hodnotenie kvality embrya v štádiu ryhovania	24

2.4.3	Hodnotenie kvality dvojdnového embrya	24
2.4.4	Hodnotenie kvality trojdnového embrya	24
2.4.5	Hodnotenie kvality embrya v štádiu moruly.....	25
2.4.6	Hodnotenie kvality embrya v štádiu blastocysty	25
2.4.6.1	Morfológia a hodnotenie kvality vnútornej masy buniek	26
2.4.6.2	Morfológia a hodnotenie kvality trofektodermu	26
2.4.7	Hodnotenie kvality embryí pomocou semikontinuálneho záznamu – TimeLapse	26
2.4.7.1	EmbryoScope+	27
2.4.7.2	Hodnotiaci systém KIDScore D5	28
2.5	Kultivačné médium embrya	30
2.5.1	Aminokyseliny	30
2.5.2	Antibiotiká	31
2.5.3	Kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)	31
2.5.4	Sacharidy	31
2.5.5	Vitamíny	32
2.5.6	Makromolekuly	32
2.5.7	Rastové faktory	33
2.5.8	pH kultivačného média a oxid uhličitý.....	33
2.5.9	Kyslík	34
2.5.10	Teplota	35
2.6	Preimplantačné genetické testovanie (PGT)	36
2.6.1	Preimplantačné genetické testovanie zamerané na aneuplo idie	37
2.6.2	Preimplantačné genetické testovanie zamerané na štruktúrne chromozómové prestavby.....	38
2.6.3	Preimplantačné genetické testovanie zamerané na monogénne ochorenia	39
2.6.4	Biopsia	39
2.7	Analýza kultivačného média	41

2.7.1	Malé nekódujúce RNA	41
2.7.1.1	Malé nekódujúce RNA v kultivačnom médiu blastocysty	42
2.7.2	Piwi-interagujúce RNA	42
2.7.2.1	Vybrané piRNA v kultivačnom médiu ako potenciálny biomarker	43
2.7.3	MikroRNA	43
2.8	Vybrané molekulové metódy detekcie piRNA	45
2.8.1	Polymerázová reťazová reakcia	45
2.8.1.1	Kvantitatívna PCR (q-PCR)	47
2.8.1.2	PCR pomocou reverznej transkriptázy (qRT-PCR)	48
2.8.2	Mikročipová analýza (Microarray)	48
2.8.3	Sekvenovanie	49
2.8.3.1	Sangerovo sekvenovanie	49
2.8.3.2	Sekvenovanie novej generácie	51
2.8.3.3	Sekvenovanie druhej generácie	51
2.8.3.4	Sekvenovanie tretej generácie	52
2.8.3.5	Pyrosekvenovanie	52
3	Cieľ práce	54
4	Materiál a metodika	55
4.1	Pracovný postup izolácie ncRNA z SBM	55
4.2	Príprava sekvenačných knižníc	56
4.3	Kontrola kvality knižnice	58
5	Výsledky	59
6	Diskusia	67
7	Záver	70
8	Zoznam skratiek	71
9	Zoznam ilustrácií	75
10	Zoznam tabuliek	76

11	Použitá literatura	77
-----------	---------------------------------	-----------

1 Úvod

Zdravie ľudskej populácie je jedným z hlavných atribútov fungovania ľudskej spoločnosti. Vysoké spoločenské nároky kladené na človeka prinášajú veľa negatívnych dopadov na jeho celkové zdravie. Vzhľadom k infertilite ako celopopulačnému problému sa v posledných dekádach významne zvýšil počet realizovaných cyklov asistovanej reprodukcie v klinickej praxi.

Napriek množstvu technických vylepšení v rámci kultivácie embryí v podmienkach *in vitro*, rovnako aj napriek vylepšeniu kultivačných médií a inkubátorov používaných v praxi, väčšina transferovaných embryí sa napriek tomu v maternici nie je schopná uhniezdiť.

Optimálna selekcia embrya v rámci IVF je rozhodujúcim krokom celej liečby. V súčasnosti používané rôzne selekčné a hodnotiace systémy kvality ľudských embryí pravdepodobne dosiahli svoj vrchol, a už nemôžu zlepšiť výsledky asistovanej reprodukcie. Je preto potrebné hľadať iný marker alebo podporné diagnostické metódy vhodné k predikcii kvality a ploidity embrya v procese IVF liečby.

Okrem analýzy markerov angiogenézy a vaskularizácie by sa pozornosť vedeckej obce mala zameriavať aj na štúdium nekódujúcich molekúl RNA, ktoré post-transkripčne regulujú génovú expresiu u eukaryotov.

Počas embryogenézy dochádza k značnej exprimácii špecifických sncRNA molekúl, ktorých hladiny je možné detegovať aj v kultivačnom médiu embrya počas jeho *in vitro* kultivácie. Kultivačné médiá sa po uskutočnení transferu embrya, alebo zmrazení embrya, stávajú „odpadovým materiálom“.

2 Súčasný stav riešenej problematiky

2.1 Neplodnosť

Neplodnosť (infertilita) je ochorenie reprodukčného systému definovaná neschopnosťou otehotnieť po 12 mesiacoch pravidelného nechráneného pohlavného styku.

Primárna neplodnosť je neschopnosť otehotnieť, zatiaľ čo sekundárna neplodnosť je definovaná ako neschopnosť otehotnieť po predchádzajúcom úspešnom tehotenstve (WHO 2018).

Celosvetovo je miera neplodnosti najvyššia vo východnej Európe, severnej Afrike a na Strednom východe. Celosvetovo 2 % žien vo veku 20 až 44 rokov nikdy nedokázalo porodiť živé dieťa a 11 % žien s predchádzajúcim živým pôrodom nedokázalo porodiť ďalšie dieťa (Walket a kol. 2022).

Neplodnosť môže byť spôsobená s mužskými, ženskými faktormi alebo kombináciou mužských a ženských faktorov, poprípade nevysvetliteľnými príčinami. Plodnosť znižuje nezdravý životný štýl ako fajčenie, nadmerný príjem alkoholu, obezita a vystavenie sa látkam, ktoré znečisťujú životné prostredie (WHO 2018). Uvádza sa, že neplodnosť je jednou z najčastejších chronických ochorení v neproduktívnom veku. Medzi hlavné príčiny tohto ochorenia patria gynekologické, andrologické, hormonálne, imunologické, hematologické a genetické príčiny (Rutstein a kol. 2004).

2.1.1 Gynekologické faktory neplodnosti

Medzi hlavné príčiny ženskej neplodnosti patria zvyčajne:

- poruchy vajčíkovodov – nepriechodné vajčíkovody, spôsobené neliečenými pohlavne prenosnými infekciami (chlamýdie, kvapavka), komplikáciami spôsobenými potratom, popôrodnou sepsou alebo operáciou v brušnej/ panvovej oblasti;
- poruchy maternice – zápalového alebo benígneho pôvodu;
- poruchy vaječníkov – syndróm polycystických vaječníkov či iné folikulárne poruchy;
- ochorenia endokrinného systému, spôsobujúce nerovnováhu reprodukčných hormónov (Rutstein a kol. 2004).

2.1.2 Andrologické faktory neplodnosti

Mužský faktor neplodnosti je definovaný jedným alebo viacerými abnormálnymi parametrami spermogramu zistenými analýzou ejakulátu alebo prítomnosťou neadekvátnej sexuálnej alebo ejakulačnej funkcie.

Medzi bežné abnormality spermogramu patria:

- nízky objem ejakulátu (hypospermia) < 1,5 ml;
- nízka koncentrácia spermií (oligozoospermia) < 15 mil/ ml;
- znížená celková pohyblivosť spermií (astenozoospermia) < 40 %;
- abnormálna morfológia spermií (teratozoospermia) < 4 %

Ako závažný stupeň mužskej neplodnosti je klasifikovaný počet spermií pod 5 miliónov na mililiter, alebo absenciou spermií v ejakuláte (azoospermia) (Rumbold a kol. 2019).

2.1.3 Hormonálne príčiny neplodnosti

Medzi hlavné hormonálne príčiny neplodnosti patria poruchy ovulácie, ktoré zahŕňajú syndróm polycystických ovárií (PCOS), hypotalamickú amenoreu (HA), predčasnú ovariálnu insuficienciu (POI), predčasná menopauza a ďalej hypotyreóza alebo hyperprolaktinémia (Thurston a kol. 2019). PCOS je najčastejšou endokrinnou poruchou, ktorá ovplyvňuje ženskú fertilitu. Celé spektrum siaha od neplodnosti, v dôsledku chronickej anovulácie a nepravidelnej menštruácie ako je amenorea alebo oligomenorea, obezita s prevahou tuku v hornej časti tela, až po dermatologické prejavy ako je seborea, alopecia, či akné v dôsledku neustáleho hyperandrogenizmu (Schmid a kol. 2004).

PCOS postihuje 6 – 15 % žien v reprodukčnom veku. Až 25 – 75 % žien s PCOS má nadváhu alebo sú obezité. Ženy s obezitou a PCOS majú nižšiu úspešnosť spontánnej gravidity alebo gravidity po *in vitro fertilizácii* (IVF). Ak sa zníži hmotnosť o 5 %, zlepšuje sa metabolický a hormonálny profil, ako aj reprodukčné funkcie (Papler a kol. 2022).

Z mužskej strany sa môže jednať o hormonálnu nerovnováhu, spôsobujúcu hypogonadizmus. Jeho terapia má vplyv na potenciál mužskej plodnosti (Ohlander a kol. 2016).

2.1.4 Imunologické príčiny neplodnosti

Imunologická neplodnosť v spojení s reprodukčným zlyhaním sa stala závažným zdravotným problémom, ktorý postihuje približne 1 z 5 párov v reprodukčnom veku. Ejakulát ako tekutina obsahujúca spermie, bunkové vezikuly či iné bunky a zložky, by mohla senzibilizovať ženský pohlavný trakt. Imunitné odmietnutie mužského semena v ženskom reprodukčnom trakte sa definuje ako zlyhanie prirodzenej tolerancie, ktorá vedie k lokálnej a/alebo systémovej imunitnej odpovedi. Môže tak dôjsť k nadmernej tvorbe antiseminálnych protilátok. Komplexné štúdie v oblasti identifikácie cieľových protilátok a stanovenie špecifickej triedy protilátok prispievajú k rozvoju účinnej imunoterapie. Na začiatku 20. storočia bolo zistené, že zvieracie spermie môžu byť imunogénne. Bolo zistené, že prítomnosť protilátok, ktoré aglutinovali a imobilizovali spermie v krvných sérach žien, nemohli otehotnieť. Tiež sa zistilo, že v krvných sérach niektorých neplodných mužov sa vyskytovali protilátky proti spermiám a ich neplodnosť korelovala s hladinou týchto protilátok. Protilátky proti spermiám sa vyskytujú rovnako u mužov aj žien. Ich výskyt bol zaznamenaný u 9 – 36 % neplodných párov. V prípade neplodných mužov sa vyskytujú asi v 8 – 21 % a u neplodných žien asi v 6 – 23 % celkovej populácie. Vyskytujú sa však aj u 12,5 % plodných mužov a u 1,4 % plodných žien. Nedá sa tak potvrdiť, že všetky protilátky proti spermiám spôsobujú neplodnosť. Sú známe monoklonálne a polyklonálne protilátky, ktoré sa viažu na spermie, ale neinhibujú proces fertilizácie ani *in vitro*, ani *in vivo* (Brazdova a kol. 2016).

2.1.5 Genetické faktory neplodnosti

V posledných rokoch bola zaznamenaná vysoká prevalencia genetických príčin poškodenia spermií, čo predstavuje 10 – 15 % mužskej neplodnosti, vrátane chromozomálnych aberácií a mutácií jedného génu (Ferlin a kol. 2007).

Chromozomálne abnormality predstavujú približne 5 % infertilitu u mužov. Abnormality chromozómu Y, napríklad mikrodélacie, sú hlavnou príčinou azoospermie a závažnej oligozoospermie. Medzi ďalšie genetické abnormality spôsobujúce neplodnosť patria Klinefelterov syndróm a Robertsonova translokácia (O'Flynn a kol. 2010). Aneuploidia, alebo nesprávny počet chromozómov je najčastejšou chybou, ktorá vyplýva z chromozomálnych abnormalít u neplodných mužov (Emery a kol. 2006).

2.1.6 Hematologické príčiny neplodnosti

Medzi hlavné hematologické príčiny neplodnosti patrí dedičná trombofília. Je rizikovým faktorom nie len kardiovaskulárneho systému, ale podieľa sa aj na reprodukčných poruchách, vrátane opakovanej straty tehotenstva a rekurentných zlyhaniach implantácie embrya (Coulam a kol. 2006).

Vrodená trombofília sa vyskytuje asi u 50 – 65 % žien s opakovanou stratou plodu. Pravdepodobnosť porodenia živého plodu je v tomto prípade iba 25 % a najväčšie riziko sa vyskytuje u nositeliek homozygotnej mutácie FV Leiden a FII 20210A. Kombinované trombofilné defekty sa zistili u 21 % žien, ktoré prekonalí stratu plodu. Predpokladá sa, že aj polymorfizmus EPCR matky alebo otca môže prispieť k riziku predčasnej straty plodu (Kubisz et al. 2010). Ženy s anamnézou rekurentné zlyhanie implantácie embrya v procese IVF a po transfere embrya vykazovali vyššiu prevalenciu celkových génových mutácií ako aj inhibítora aktivátora plazminogénu PAI-1 4G/4G (Coulam a kol. 2009).

2.1.7 Idiopatická neplodnosť

Nevysvetliteľná neplodnosť (unexplained infertility, UI) je páru diagnostikovaná štandardnými vyšetreniami vrátane analýzy ejakulátu, kontrole ovulácie a potencie vajíčkovodov, ktoré nevykazujú akúkoľvek abnormalitu. Prevalencia UI dosahuje až 30 % neplodných párov vzhľadom na štandardné vyšetrenia. Predpokladá sa, že diagnóza UI je subjektívne hodnotená a často nesprávne diagnostikovaná ako endometrióza, tubárna neplodnosť, predčasné ovariálne zlyhanie či imunologická neplodnosť (Brazdova a kol. 2016).

Počet folikulov je podmienený geneticky a ženská subfertilita spôsobená zlou ovariálnou rezervou sa diagnostikuje, ak zostávajúci počet folikulov predstavuje časť pôvodného počtu. K tomuto stavu dochádza vo veku 30 rokov. Kritický bod sa dosiahne vo veku 38 – 40 rokov, keď sa počet folikulov znižuje na približne 25 000. Vo veku 50 rokov sa počet folikulov znižuje približne na 1000 (Templeton a kol. 2003).

Imunologická tolerancia má kľúčovú úlohu v UI. Molekulárna a bunková nedostatočnosť endometria vedúce k zlyhaniu implantácie embrya môže súvisieť s UI. Následne prirodzená imunosupresia nezabráni imunitnému odmietnutiu matky. T – regulačné bunky (Treg) sú súčasťou imunitnej tolerancie a chránia plod pred imunitným útokom.

UI je spojená nie len s diferenciáciou Treg, a teda so zlyhaním potlačenia imunity, ale aj s jeho distribúciou v mieste implantácie. Je to spôsobené zníženou expresiou a nedostatočnou

funkciou lymfocytov a chemotaktických agens prítomných v maternici. Nakoľko je Treg diferenciácia regulovaná transformujúcim rastovým faktorom, idiopatická neplodnosť môže súvisieť so zníženou dostupnosťou tohto faktora (Brazdova a kol. 2016).

2.2 Biochemický cyklus preimplantačného embrya

Preimplantačný vývoj embrya začína po oplodnení oocyty a končí tesne pred implantáciou embrya na sliznicu maternice. Prvé tri dni po ovulácii v oocyte, zygoty a embryu chýba transkripcia, syntéza vlastných ribonukleových kyselín. Počas tohto obdobia prebehne oplodnenie oocyty, aktivácia oocyty, vznikne zygoty, prebehne epigenetické reprogramovanie a tri mitózy, a obdobie transkripčného kľúdu je zakončené aktiváciou embryonálneho genómu v osembunkovom štádiu embrya (Trávník a kol. 2022).

2.2.1 Inseminácia oocyty

V IVF cykle sa oocyty získavajú zvyčajne v hyperstimulovaných cykloch približne 36 – 42 hodín po injekčnom podaní ľudského chóriového gonadotropínu (hCG). V stimulovanom cykle by ovulácia mala nastať približne 37 hodín po náraste hCG. Z tohto dôvodu IVF centrá vykonávajú dva spôsoby inseminácie - IVF a intracytoplazmatickú injekciu spermie (ICSI) v definovanom časovom intervale po odbere oocytov, počas ktorého musí nastať inseminácia alebo ICSI. Predinkubačná doba sa pohybuje od 3 do 6 hodín medzi odberom oocytov a ICSI, čo by malo zlepšiť rýchlosť oplodnenia a kvalitu embrya (Jacobs a kol. 2001).

K úspešnému oplodneniu dôjde v priebehu 16 – 20 hodín po inseminácii, a dôjde k vygenerovaniu dvoch prvojadier (pronucleus). Obe prvojadrá sú rovnako veľké a obsahujú 4 – 8 pronukleolov v jemne rozptýlenom chromatine postupne sa kondenzujúcom smerom k druhému prvojadru. Toto štádium označujeme ako zygoty, ktorá má priemer asi 110µm. Je obklopená obalom nazývaným *Zona Pellucida* (ZP). V perivitelínnom priestore medzi ZP a oolémou zygoty, sú prítomné dve pólóvé telieska – pólocyty. Prvé pólóvé teliesko začína približne po 15 hodinách po oplodnení degradovať (Trávník a kol. 2022). Po oplodnení dochádza k ďalším mitotickým deleniam, ktoré sa označujú ako brázdenie (ryhovanie) (Hobson a kol. 2012).

2.2.2 Blastogenéza

Blastogenéza predstavuje proces vzniku zygoty, jej následné ryhovanie až po vznik moruly a premenu moruly na blastocystu. Brázdenie (ryhovanie) sa začína delením zygoty na dvojbunkové embrya a pokračuje exponenciálne. Na druhý deň má embrya štyri bunky a na tretí deň okolo 72. hodiny by malo mať embrya okolo 8 buniek (Hobson a kol. 2012).

2.2.2.1 Morula

Počas štádia moruly strácajú blastoméry zreteľné hranice expresiou E-cadherínu (Burns a kol. 2006, Trávník a kol. 2022). Dochádza k tvorbe medzibunkových spojov - tesné spojenia (tight junctions), ktoré utesňujú medzibunkové kontakty medzi bunkami budúceho trofoblastu, a následne vodivé spojenia (gap junctions), ktoré umožňujú medzibunkovú komunikáciu (Trávník a kol. 2022). Počas kompaktácie vykazujú blastoméry skoré známky polarizácie a zväčšujú svoju kontaktnú plochu medzi jednotlivými bunkami. Okrem dôležitého kroku, ktorým je v rámci vývoja kompaktácia, je transformácia moruly do štádia blastocysty. To predstavuje základné bunkové preskupenia vrátane internalizácie a tvorby lumenu (Gauster a kol. 2022).

2.2.2.2 Blastocysta

Prenos embryí v štádiu blastocysty poskytuje lepšiu synchronizáciu medzi endometriom maternice a embryom. Ďalšou výhodou transferu blastocysty je výber kvalitnejších embryí s vyšším implantačným potenciálom (Shoukir a kol. 1998).

Embryá v štádiu blastocysty pozostávajú z dvoch odlišných typov buniek – trofektodermu (TE), ktorý vytvára extraembryonálne štruktúry a vnútornej bunkovej hmoty (ICM), z ktorej sa vytvára fetálne a extraembryonálne tkanivo (Peterson a kol. 2012). Dôležitým momentom v embryonálnom vývoji je hromadenie tekutiny medzi bunkami v štádiu moruly. Ak sa objem tekutiny zväčšuje osmotickým tlakom, postupne sa vytvára dutina vytvárajúca blastocel, čím sa zvyšuje počet buniek. To spôsobuje zväčšovanie blastocysty a následné progresívne stenčovanie *Zona pellucida*. Konečným procesom je uvoľnenie blastocysty zo ZP procesom nazývaným hatching. Počet buniek, ktoré tvoria blastocystu sa môže líšiť v rozmedzí 24 až 322 buniek, čo sa odráža na morfológii blastocysty (Hardarson a kol. 2012).

2.3 Genetické formovanie embrya v jednotlivých dňoch

Preimplantačný vývoj embrya je charakterizovaný sledom udalostí od oplodnenia ľudského zrelého oocytu, vrátane formovania materského a otcovského prvojadra, po ktorom nasleduje tvorba zygoty. Tá sa následne mitoticky delí každých 12-18 hodín, až dosiahne štádium moruly a prípadne štádium blastocysty s veľkým počtom buniek pred samotnou implantáciou. Embryonálna transkripcia nie je potrebná v štádiách štiepenia, pretože počiatkové štádiá vývoja sú závislé na proteínoch a transkriptoch, ktoré sa nahromadili v oocyte počas jeho dlhého vývoja, pozastaveného v profáze meiózy I pred oplodnením (Kakourou a kol. 2013).

2.3.1 Prechod z meiózy do mitózy

Počas oplodnenia vajíčka spermiov sa haploidné genómy rodiča zjednotia, aby došlo k vytvoreniu diploidného genómu nového a jedinečného jedinca. U žien, reprodukčné bunky – oocyty, sú uložené vo vaječníkoch ešte pred samotným narodením (Baibakov a kol. 2012).

Oocyty už prešli replikáciou meiotickej DNA a rekombináciou, ktorá zabezpečuje genetickú diverzitu potenciálnych potomkov. Oocyty sú pozastavené v meiotickej profáze a obklopené somatickými bunkami v primordiálnom folikule. Oocyty zväčšujú svoju veľkosť a akumulujú zásoby, ktoré sú potrebné pre vývoj skorého embrya. V každom menštruačnom cykle dôjde k nárastu gonadotropínov, ktoré indukujú ich meiotické dozrievanie. Ešte vo folikule sa jadro oocytu rozpadne a okolo chromozómov sa zhromažďuje vretienko mikrotubulov. Vretienko napokon migruje na povrch oocytu a segreguje polovicu homológnych chromozómov do malej bunky, ktorá sa nazýva pólóvé teliesko. Zvyšné chromozómy sú zachytené druhým meiotickým vretienkom a oocyt v tomto štádiu vyčkáva a čaká na oplodnenie spermiov. Fúzia spermie s plazmatickou membránou oocytu spúšťa ukončenie procesu druhého meiotického delenia a následný prechod do mitózy. Sériou oscilácií Ca^{2+} sa spúšťa časovo usporiadaný sled udalostí, vrátane uvoľnenia kortikálnych granúl, a dokončenie druhého meiotického delenia, translácie materských mRNA a samotný prechod z meiózy do mitózy (Clift & Schuh, 2013). Transkripcia sa zastaví pred koncom rastovej fázy oocytu, kedy je chromatín vysoko kondenzovaný a obklopuje jadierko (Bouniol-Baly a kol. 1999).

Až v štádiu 4-bunkového embrya sa transkripcia následne obnoví, a preto dozrievanie oocytov, oplodnenie a množstvo bunkových modifikácií, ktoré riadia prechod z oocytu do

embrya, sa vyskytujú v neprítomnosti regulácie transkripcie (Clift & Schuh, 2013). Pri skorom štiepení embrya je dôležitým kontrolným bodom degradácia materských faktorov pri prechode z oocyту na embryo (Ramathal a kol. 2015).

2.3.2 Aktivácia embryonálneho genómu

Oplodnenie oocytov v štádiu MII spermiami je transkripčne pokojné. Prvá transkripcia v novovytvorených embryách je známa ako embryonálna aktivácia genómu (EGA), pričom jej nástup a načasovanie sú nejasné. V ľudských embryách dochádza k EGA v osembunkovom štádiu embrya, po 68. hodinách po oplodnení (Assami a kol. 2022). Základ embrya je tak postavený na štruktúrach a informácii materského pôvodu a následne je postupne prestavovaný na základe aktivácie embryonálnych génov. Ľudské blastoméry sú v začiatkoch navzájom transkripčne podobné a do osembunkového štádia nie sú definované bunkové línie. Prechod od aktivity materského genómu k embryonálnemu prebieha v malých a veľkých vlnách. Pri prechode do osembunkového štádia dôjde k veľkej vlne transkripcie zahájením expresie transkripčného faktoru. Okrem kódujúcej RNA sú transkribované aj nekódujúce RNA ako malé nekódujúce RNA (small non-coding RNA, sncRNA), dlhé nekódujúce RNA (long non-coding RNA, lncRNA), endogénne retrovíry a repetitívne elementy s potenciálnou regulačnou funkciou (Trávník a kol. 2022).

2.3.3 Implantácia embrya

Úspešná implantácia embrya je zložitý proces vyžadujúci si koordinovaný sled udalostí, ktorý zahŕňa interakciu medzi embryom a endometriom maternice. Kľúčom k tomuto procesu je zložitá kaskáda molekulárnych mechanizmov, ktoré sú regulované endokrinnými, parakrinnými a autokrinnými modulátormi embryonálneho a materského pôvodu (Hernández-Vargas a kol. 2020). Implantácia je definovaná ako proces, pri ktorom trofektoderm vyvíjajúcej sa blastocysty prilne k endometriu maternice. Rozlišujeme tri fázy implantácie: apozícia, adhézia a invázia (McGowen a kol. 2014).

2.3.3.1 Apozícia

Implantácia embrya začína apozíciou blastocysty do maternice zvyčajne 2 – 4 dni po vstupe moruly do dutiny maternice. Prostaglandín sa považuje sa jeden z najdôležitejších regulátorov invázie trofoblastov, ktorý aktivuje ďalšie signálne proteíny. Počas procesu

apozície sa blastocysta diferencuje na vnútornú bunkovú hmotu – embryo a trofektoderm – placenta. Stromálne bunky, ktoré obklopujú implantujúcu sa blastocystu, sa diferencujú do špecializovaného typu buniek, ktoré sa nazývajú decíduálne bunky v procese známom ako decidualizácia (Su-Mi a kol. 2017).

2.3.3.2 Adhézia

Bunková adhézia trofektodermu blastocysty je sprostredkovaná bunkovými adhéznymi molekulami, vrátane integrínov, kadherínov, selektínov a imunoglobulínov (Su-Mi a kol. 2017).

Prestup blastocysty epitelom uľahčuje rozvoľnenie väzby medzi epitéliami endometria, ktoré sú sprostredkované E-cadherínom. Pod vplyvom progesterónu je v epitéliových bunkách endometria exprimovaný kalcitonín, ktorý vedie k presunu vápniku do cytoplazmy buniek a to spôsobí rozvoľnenie cadherínovej väzby medzi bunkami. V okamihu, keď sa blastocysta naviaže na endometrium, kolabuje, takže do endometria vstupuje s menším priemerom a väčšinou je už po 40 hodinách úplne zanorená do vrchných partií funkčnej zóny endometria. K zanoreniu dochádza embryonálnym pólom, teda časťou, kde sa nachádza embryoblast. Epitéliová vrstva sa nad implantačným kráterom obnoví medzi 10. až 11. dňom vývoja. Na sliznici maternice sa dočasne kolabovaná blastocysta opäť nafúkne a následkom rastu blastocystovej dutiny sa ešte viac zväčší, čím na konci implantácie dosiahne priemer 2 – 3 mm, čo môžeme na sonografe pozorovať ako gestačný vačok (Trávník a kol. 2022).

2.3.3.3 Invázia

Počas proliferácie sa trofoblast rozlíši na dve zložky, cytotrofoblast a syncytiotrofoblast. Diferenciácia trofoblastu v cytotrofoblast a syncytiotrofoblast postupuje od embryonálneho k anembryonálnemu pólu blastocysty. Sliznica maternice reaguje na implantovanú blastocystu decíduálnou reakciou, ktorá sa prejavuje zmnožením ciev okolo blastocysty a premenou fibroblastov slizničného väziva na väčšie a zaguľatené decíduálne bunky, ktoré obsahujú v cytoplazme väčšie množstvo glykogénu a tukové kvapôčky (Trávník a kol. 2022).

2.3.3.4 Implantačné okno

Implantačné okno je definované ako perióda, kedy je maternica pripravená k implantácii voľne uloženej blastocysty. Zahŕňa časový úsek, kedy je voľná blastocysta schopná pokračovať vo svojom vývoji v dutine maternice a zahájiť implantáciu. Toto obdobie vnímavosti je krátke a vyplýva z naprogramovanej postupnosti pôsobenia estrogénu a progesterónu na endometrium (Harper, 1992). Implantačné okno začína za fyziologických podmienok najčastejšie 19. až 21.

deň cyklu, respektíve 4. až 7. deň po zvýšení koncentrácie progesterónu. Poloha IO je individuálna a dá sa presne objektivizovať na základe charakteristickej génovej transkripcie buniek endometria. Otehotnenie nastáva najpravdepodobnejšie, keď je blastocysta na správnom stupni vývoja prítomná v dutine maternice v rozmedzí ± 12 hodín, s malou pravdepodobnosťou v rozmedzí ± 24 hodín od stredu individuálneho implantačného okna (Trávník a kol. 2022).

2.4 Hodnotenie kvality embryí

Precízne hodnotenie kvality embryí je dôležité z hľadiska úspešného IVF procesu (Magli a kol. 2012). Od začiatku terapeutického využitia ľudských embryí kultivovaných *in vitro* sa hľadali metódy, ktoré by umožnili vybrať embryo s dobrou perspektívou k ďalšiemu vývoju, nie len so zdravým fenotypom, ale aj genotypom. Základnou a najpoužívanejšou neinvazívnou metódou je morfológické hodnotenie kvality embryí – statické alebo pomocou time-lapse systému (Trávník a kol. 2018). Bolo vyvinutých niekoľko skórovacích systémov, ktoré sú založené na morfológických znakoch deliaceho sa embrya. Tieto klasifikačné systémy hodnotenia kvality embryí sú založené na hodnotení počtu blastomér, tvaru a veľkosti blastomér, rozsahu a lokalizácie fragmentácie, kvality cytoplazmy, prítomnosť granularity alebo vakuol, prítomnosti multinuklearity buniek, stavu kompaktácie embrya a v neposlednom rade, kvality samotnej blastocysty (Magli a kol. 2012, Toporcerová a kol. 2015).

2.4.1 Hodnotenie kvality pronukleárneho štádia

Vyšetrenie prvojadier nás informuje či došlo k oplodneniu a počet prvojadier poskytuje informáciu či došlo k oplodneniu jednou haploidnou spermiovou. Vyšetrenie prvojadier vykonávame 16 – 18 hodín po inseminácii. Správny počet prvojadier musí byť 2, kedy zygota obsahuje jedno ženské a jedno mužské prvojadro (Trávník a kol. 2018).

Existujú rôzne systémy skórovania prvojadier, pri ktorých sa hodnotia pronukleoly. Skórovací systém pronukleárných oocytov sa opiera o tri hlavné znaky:

- veľkosť a umiestnenie jadier,
- vzhľad cytoplazmy,
- veľkosť a distribučné znaky nukleárných pólových teliesok v jadrách (Scott a kol. 2003).

Fyziologický počet pronukleolov má byť medzi 5 – 7 v jednom prvojadre. Pri hodnotení pronukleárneho oocytu by mali byť jadrá rovnako veľké a centrálné uložené. Ak jadrá nie sú rovnakej veľkosti, majú embryá následne spomalený vývoj, malé množstvo z nich dosiahne štádium blastocysty a majú vysoký stupeň aneuploidie (Trávník a kol. 2018, Scott a kol. 2003). Ak nie sú lokalizované centrálné, mohlo by to naznačovať zlyhanie z niektorých mechanizmov v procese oplodnenia, napr. tvorba mikrotubulov. Pronukleárne oocyty, ktoré majú rôznu veľkosť, sú umiestnené na periférii, alebo prvojadrá, ktoré sa nevygenerovali do 16. – 18. hodín

po inseminácii, sú hodnotené ako abnormálne a len zriedka sa používajú pri prenose (Scott a kol. 2003).

Zistilo sa, že vzhľad cytoplazmy u pronukleárných oocytov môže byť rôzny, v súvislosti s redistribúciou mitochondrií (Van Blerkom a kol. 1984). Za fyziologických podmienok sú mitochondrie väčšinou okolo jadier s prejasnením v perikortikálnej oblasti (Van Blerkom et al. 1995a). Prítomnosť prejasnenia (halo efekt) na periférii cytoplazmy zygoty svedčí o dobrej vývojovej perspektíve embrya (Trávník a kol. 2018).

Absencia a predĺženie cytoplazmatického halo počas oplodnenia negatívne koreluje s porodením živého dieťaťa po prenose embrya. To poukazuje na významnosť morfokinetických parametrov cytoplazmatického halo počas oplodnenia a možno ho použiť k precíznejšiemu výberu vhodných embryí (Ezoe a kol. 2021).

2.4.2 Hodnotenie kvality embrya v štádiu ryhovania

Dôležitým znakom úspešného vývoja je včasné delenie dvojbunkového embrya (early cleavage). Early cleavage je významným indikátorom kvality embryí a používa sa ako dodatočné kritérium pri výbere embrya na prenos k zvýšeniu miery gravidity a zníženiu viacpočetnej gravidity. Zygoty v tomto štádiu sú kontrolované ešte v ten deň medzi 25 – 27. hodinou po inseminácii (Fu a kol. 2009). Hodnotí sa prítomnosť pravidelného symetrického štiepenia a percento fragmentácie (Fisch a kol. 2003).

2.4.3 Hodnotenie kvality dvojdňového embrya

Morfológia dvojdňového embrya sa hodnotí okolo 44 – 46. hodiny po inseminácii. Hodnotí sa počet blastomér, stupeň fragmentácie, symetria blastomér a prítomnosť multinuklerity v jednotlivých blastoméroch. Ak je počet blastomér štyri, percento fragmentácie < 10 % a blastoméry sú symetrické, embryo má vynikajúcu kvalitu (Fu a kol. 2009).

2.4.4 Hodnotenie kvality trojdňového embrya

Na tretí deň vývoja majú embryá 8 buniek (Toporcerová a kol. 2015). Počas týchto delení zostáva celkový objem embrya rovnaký a embryo vyplňa zónu. To znamená, že jednotlivé bunky – blastoméry, sú po každom delení menšie. Aj v tomto štádiu sa hodnotí počet blastomér, stupeň fragmentácie a symetria blastomér.

2.4.5 Hodnotenie kvality embrya v štádiu moruly

Na štvrtý deň vývoj embryí by malo byť prítomné 16 – 32 bunkové štádium kompaktovaného embrya, ktoré sa nazýva morula. Ak embryo dosiahne štádium 16 bunkového embrya, začne sa podobat' moruši, odkiaľ pochádza názov morula (*lat. morus: moruša*) (Sherman a kol. 2001).

2.4.6 Hodnotenie kvality embrya v štádiu blastocysty

V súčasnej dobe sa štandardne embryá kultivujú do štádia blastocysty, čo viedlo k potrebe morfológického bodovacieho systému. Systém klasifikácie blastocysty zaviedol Gardner a Schoolcraft v roku 1999 a bol aplikovaný väčšinou IVF laboratórií. Tento systém klasifikuje stupeň expanzie blastocysty ako aj morfológického vzhl'adu vnútornej bunkovej hmoty a buniek trofektodermu (Hardarson a kol. 2012).

Systém hodnotenia expanzie blastocysty sa rozdeľuje do šiestich kategórií hodnotených číslom 1-6 a klasifikácia ICM (sekcia B) a TE (sekcia C) do troch kategórií, zastúpené písmenom, pričom písmeno A reprezentuje najvyššiu kvalitu (Khurram a kol. 2007). Gardner a Schoolcraft (1999) používali numerický bodovací systém navrhnutý Istanbulským konsenzom.

- Blastocysta 1. stupňa - klasifikovaná dutinou, ktorá je menšia ako polovica objemu embrya.
- Blastocysta 2. stupňa je klasifikovaná dutinou blastocelu, ktorá predstavuje polovicu alebo viac ako polovicu objemu blastocysty.
- Blastocysty 3. stupňa sú tie, v ktorých dutina blastocelu úplne vyplňa embryo.
- Blastocysty 4. stupňa sú klasifikované dutinou blastocysty, ktorá je väčšia ako pôvodný objem embrya a ZP je stenčená.
- Blastocysty 5. stupňa alebo liahnutie blastocysty, v ktorých je dutina väčšia ako pôvodný objem embrya a bunky TE sa liahnu z prirodzene porušenej ZP.
- Blastocysty 6. stupňa alebo vyliahnuté blastocysty sú tie, ktoré sa úplne vyliali z prirodzene porušenej ZP (Hardarson a kol. 2012).

2.4.6.1 Morfológia a hodnotenie kvality vnútornej masy buniek

Vnútoraná bunková hmota alebo embryoblast je štruktúra v ranom vývoji embrya a tvorí sa v blastocyste pred jej implantáciou do maternice. Embryoblast je jediná pluripotentná bunková línia v blastocyste a vytvára vrstvy epiblastov a hypoblastov. (<https://discovery.lifemapsc.com/in-vivo-development/inner-cell-mass/inner-cell-mass>).

Kvalita A – ICM obsahuje veľa buniek, ktoré sú kompaktované a pravidelne usporiadané.

Kvalita B – ICM obsahuje niekoľko buniek, ktoré sú voľne zoskupené.

Kvalita C – ICM obsahuje veľmi málo buniek, ktoré sú voľne zoskupené (Balaban a kol. 2000).

2.4.6.2 Morfológia a hodnotenie kvality trofektodermu

Trofektoderm je vonkajšia vrstva buniek blastocysty a má kľúčovú úlohu pri apozícii, adhézii a invázii do endometria, čím umožňuje blastocyste implantovať sa do maternice. (Aplin et al. 2000, Tang et al. 2020). Bunky trofektodermu produkujú niekoľko molekulárnych faktorov, ktoré pomáhajú pri implantácii embrya (Aplin a kol. 2000). Z buniek TE sa následne stávajú fetálne extreembryonálne membrány ako aj samotná placenta (Hardarson a kol. 2012).

Kvalita A – trofektoderm je vytvorený pravidelnými bunkami.

Kvalita B – trofektoderm je tvorený veľkými, menej početnými bunkami, ktoré sú usporiadané nepravidelne.

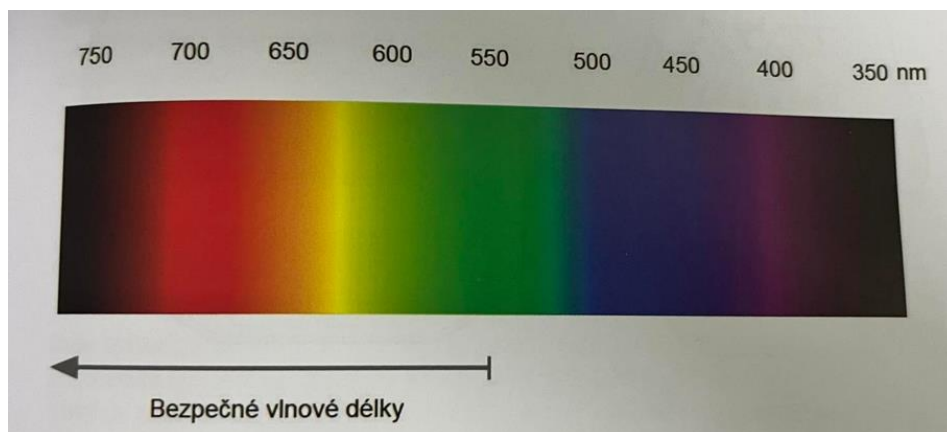
Kvalita C – trofektoderm obsahuje veľmi málo veľkých nepravidelných buniek (Hardarson a kol. 2012).

2.4.7 Hodnotenie kvality embryí pomocou semikontinuálneho záznamu – TimeLapse

Embryológovia štandardne vyberajú kultivačné misky s embryami z inkubátora raz denne, aby vyhodnotili kvalitu embryí, čo však poskytuje iba priebeh dynamického procesu embryí. Embryá dobre netolerujú narušenie ich optimálnych podmienok, a tento problém je riešiteľný pomocou časozbernej technológie bez vyberania kultivačných misiek z inkubátora (Kovacs, 2014).

Hodnotenie optického záznamu embrya je založené na postupnom snímaní mikroskopických snímok vyvíjajúcich sa embryí v intervaloch 5 – 20 minút vo viacerých

ohniskových rovinách. Záznam sa väčšinou hodnotí softwarom, ktorý registruje väčšie zmeny v obraze, čím umožňuje vyhľadať dôležité udalosti, napríklad vznik prvojadier, mitotické delenie, kompaktáciu či tvorbu blastocysty. Vzhľadom k vylúčeniu potenciálneho poškodenia embrya pôsobením fotónov na biomolekuly, sa využíva monochromatické svetlo s nízkou intenzitou a vhodná vlnová dĺžka a expozícia býva veľmi krátka – zlomky sekúnd. Nakoľko energia fotónov stúpa so skracujúcou sa vlnovou dĺžkou, volí sa svetlo v červenej až zelenej časti spektra. Celková doba expozície svetla je v prípade TimeLapse systémov podstatne nižšia než pri konvenčnom prezeraní pod mikroskopom (Trávník a kol. 2018). Časozberné technológie majú embryológom pomôcť vo výbere embrya s najvyšším implantačným potenciálom, čím by malo dôjsť k zlepšeniu klinického výsledku (Kovacs, 2014).



Obrázok 1 Bezpečné farby svetla pre použitie v TimeLapse (Trávník a kol. 2018).

2.4.7.1 EmbryoScope+

Inkubátor EmbryoScope+ je trojplynový inkubátor, ktorý v priebehu vývoja embryí poskytuje sériu meraní jednotlivých embryí. Meranie zahŕňa vyhotovenie časozberných mikroskopických snímok vo viacerých ohniskových rovinách a záznam inkubačných podmienok. Systém inkubátora obsahuje dva samostatné systémy – systém počítača a mikroskopu, ktorý riadi akvizíciu snímok, a systém riadenia plynov a teploty, ktoré riadia podmienky inkubácie (Trávník a kol. 2018).

Embryá sa kultivujú v kultivačných miskách, ktoré obsahujú mikrojamky. Táto viacjakamková miska umožňuje monitorovanie 8 alebo 16 individuálne kultivovaných embryí (Kovacs, 2014). Tieto misky musia byť zhotovené z veľmi čistého polystyrénu a testované na cytotoxicitu, pyrogenitu a embryotoxicitu (Trávník a kol. 2018). EmbryoScope+ môže súčasne

sledovať 16 misiek a používa nízko-intenzívne červené LED svetlo (635 nm) s 0,5 sekundovou dobou expozície (Kovacs, 2014).

2.4.7.2 Hodnotiaci systém KIDScore D5

Model je založený na morfológii a morfokinetických vlastnostiach, ktoré súvisia s implantačným potenciálom embryí transferovaných na piaty deň kultivácie. Embryológom má pomôcť pri rozlíšení medzi embryami s vysokou a nízkou pravdepodobnosťou implantácie. Tým sa znižuje počet embryí, ktoré budú musieť pracovníci kliniky brať do úvahy na prenos alebo mrazenie.

Pri používaní modelu musia byť v komentári uvedené minimálne premenné, ktoré sa používajú v modeli KIDScore D5:

PN – počet prvojadier.

t2 – doba od inseminácie do úplného rozdelenia na dve bunky.

t3 – doba od inseminácie do úplného rozdelenia na tri bunky.

t5 – doba od inseminácie do úplného rozdelenia na päť buniek.

tB – doba od inseminácie do vytvorenia blastocysty.

ICM – zhodnotenie kvality vnútornej bunkovej hmoty.

TE – zhodnotenie kvality trofektodermy.

Medzi 115. a 120. hodinou po inseminácii by mali byť uvedené ako premenné ICM a TE. Obe premenné musia mať samostatný a nezávislý stupeň od A po C, pričom A charakterizuje najvyššiu kvalitu a C charakterizuje najnižšiu kvalitu.

- **Inner Cell Mass**

A – mnoho husto zhluknutých buniek, ohraničenie buniek už nie je zreteľné, bez vakuol a bunkovej drte.

B – prítomných niekoľko buniek a vrstva môže byť menej husto zhluknutá. Môže byť prítomných niekoľko vakuol alebo známky degenerácie.

C – veľmi málo buniek voľne zhlukovaných. Bunky sú veľké a môže vykazovať zreteľné ohraničenie. Vo vrstve môžu byť vakuoly, degenerované bunky alebo samostatné bunky.

- **Trofektoderm**

A – mnoho plochých buniek (> 40), ktoré tvoria vrstvu vystielajúcu dutinu blastocysty. Bunky obsahujú zreteľne viditeľné jadrá a cytoplazma je homogénna.

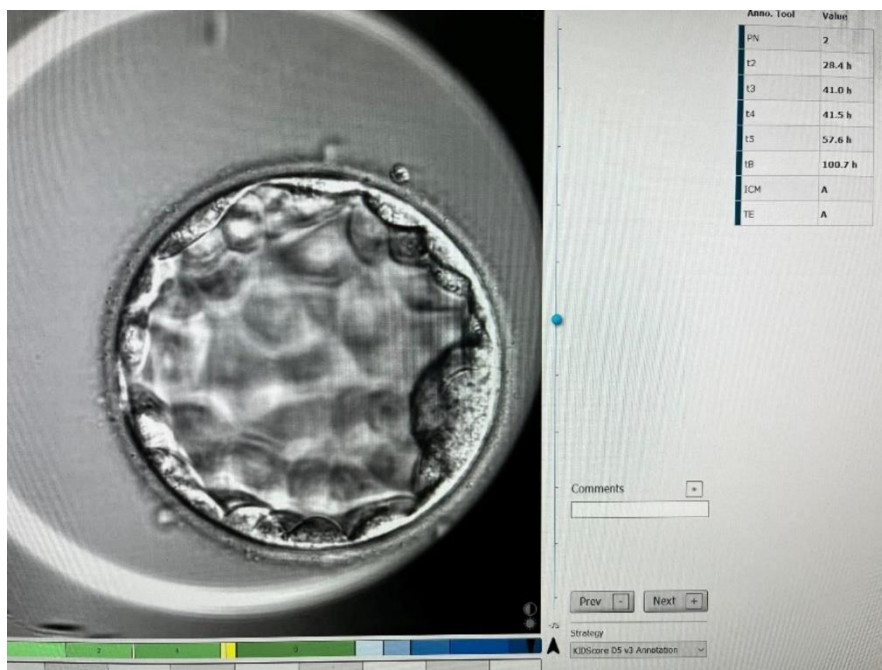
B – niekoľko (> 20) buniek a vrstva nie je úplne súdržná a tvar buniek vo vrstve je rôzny. Bunková cytoplazma sa môže zdať nehomogénna a môže byť ťažké rozlíšiť jadrá.

C – Obsahuje veľmi málo buniek, ktoré sú často veľké a rozprestreté na veľkej ploche. Cytoplazma sa zdá byť nehomogénna a môžu byť prítomné vakuoly.

Ak sa použije tento model, tak je každému embryu pridelené skóre. Skóre je v rozmedzí od 1 do 9,9 a rozdiel medzi dvomi skóre môže byť aj minimálne jedno desatinné miesto. Embryá bez úspešnej fertilizácie, dostanú skóre 0.

Skóre sa priradzuje na základe troch kombinovaných faktorov:

- Pravidelnosť ryhovania
- Rýchlosť vývoja
- Kvalita blastocysty (https://www.vitrolife.com/globalassets/support-documents/product-manuals/czech/kidscore_d5_appendix_cs-cz.pdf)



Obrázok 2 Anotčný systém KidScore z EmbryoScope+ (Gynicare, 2023).

2.5 Kultivačné médium embrya

Cieľom kultivácie embryí v asistovanej reprodukcii je zlepšiť kvalitu vývoja embryí v laboratóriu. Embryá sa v prvých štádiách delenia fyziologicky vyvíjajú vo vajíčkovode, a prirodzené prostredie pre moruly a blastocysty je dutina maternice. Pôvodne bolo bežné používať média umožňujúce kultiváciu ľudských oplodnených embryí *in vitro* 2 až 3 dni, k dosiahnutiu štádia štyroch až ôsmich buniek a následným prenosom embrya do maternice (Gruber a kol. 2011). Ľudské embryá sa prvýkrát kultivovali do šestnásťbunkového štádia. Neskôr boli embryá kultivované *in vitro* až do štádia blastocysty (Biggers a kol. 2004).

Embryá oplodnené *in vitro* vyžadujú špecifické podmienky, v závislosti od štádia preimplantačného embrya. Kultivačné médium je pre embryo cudzím prostredím. Dizajn médií je komplikovaný a zložky sa musia vhodne vyberať s určitými koncentráciami, ktorých cieľom je minimalizovať stres pre kultivované embryo (Gruber a kol. 2011).

Medzi hlavné komponenty obsiahnuté v kultivačných médiach radíme:

2.5.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny sú dôležité regulátory preimplantačného vývoja embryí. Embryo využíva karboxylové kyseliny a aminokyseliny ako zdroje energie pred expresiou embryonálneho genómu (Gruber et al. 2011). Pri kultivácii embryí *in vitro* od štádia zygoty po štádium blastocysty sa ich kvalita významne zlepšuje v prítomnosti neesenciálnych aminokyselín (NEAA) spolu s glutamínom. Niektoré aminokyseliny fungujú ako biosyntetické prekurzorové molekuly, osmolyty, tlmivé roztoky vnútorného pH, antioxidanty a chelátory (Quinn, 2014).

Neesenciálne aminokyseliny – asparagín, aspartát, glycín, histidín, serín, taurín a glutamín stimulujú rast embrya počas prvého delenia. Naproti tomu bol pozorovaný inhibičný účinok cysteínu, izoleucínu, leucínu, fenylalanínu, treoínu a valínu na vývoj blastocýst a životaschopnosť (Gardner a kol. 1993).

V štádiu kompaktácie obe skupiny aminokyselín pôsobia stimulačne na vnútornú bunkovú hmotu (ICM), pričom neesenciálne aminokyseliny a glutamín vedú k stimulácii trofektodermy a vyliatia zo ZP.

Aminokyseliny však v kultivačných médiách, špeciálne glutamín, podliehajú spontánnemu rozkladu počas inkubácie pri 37 °C, čo vedie k uvoľneniu amóniových iónov do kultivačného média. Amónium pôsobí na embryo toxicky a znižuje jeho životaschopnosť

v dôsledku vnútrobunkovej acidifikácie (Gruber a kol. 2011, Quinn, 2014). Aby sa zabránilo nožnej akumulácii amónnych iónov v kultivačnom médiu pri 37 °C inkubácii, je potrebná výmena kultivačného média každých 48 hodín (Quinn, 2014).

2.5.2 Antibiotiká

Bakteriálna kontaminácia počas kultivácie embryí je vážnym problémom vo všetkých laboratóriách pri oplodnení *in vitro*. Frekvencia mikrobiálnej kontaminácie je medzi 0,35 % a 0,86 % (Li a kol. 2022).

Kultivačné médiá sú rutinne dopĺňané antibiotikami, aby sa zabránilo bakteriálnej kontaminácii. V súčasnej dobe sa využívajú antibiotiká: penicilín, streptomycín a gentamycín. Antibakteriálny účinok penicilínu sa pripisuje jeho schopnosti narušiť integritu bunkovej steny prostredníctvom inhibície syntézy peptidoglykánov. Streptomycín a gentamycín narušajú syntézu bakteriálnych proteínov, pričom na embryá nepôsobia toxicky (Gruber a kol. 2011).

2.5.3 Kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)

Kyselina etylendiamintetraoctová pôsobí ako ligand a chelatačné činidlo k regulácii koncentrácie ťažkých kovov. Pridaním EDTA do kultivačného média sa zmierňuje zastavenie delenia v štádiu 2-bunkového embrya a inhibuje predčasné využitie glykolýzy embryami v štádiu prvého delenia. EDTA v koncentrácii 0,1 mmol/l znižuje vývoj blastocysty a počet buniek (Gruber a kol. 2011).

2.5.4 Sacharidy

Pyruvát, laktát a glukóza sú primárne energetické substráty pre preimplantačné embryá (Dean a kol. 2017). Embryo v ranom štádiu vývoja má jednoduchú fyziológiu a udržiava si nízku úroveň oxidačného metabolizmu (Leese a kol. 1984).

Počas preimplantačného vývoja je hlavným zdrojom energie Krebsov cyklus. Včasnú štádiu preimplantačného vývoja využívajú k tvorbe energie cyklus kyseliny citrónovej a oxidatívnej fosforylácie s pyruvátom ako primárny substrát. S formovaním blastocysty dochádza k zvýšeniu rýchlosti biosyntézy aj k nárastu konzumácie kyslíka (Trávník a kol. 2022, Leese a kol. 1984). To vedie k zvýšeniu energetických nárokov v čase, keď je embryonálny genóm aktivovaný alebo v štádiu kompaktácie. Glukóza nie je schopná podporovať vývoj až

do 4 – bunkového štádia embrya (Leese a kol. 1984). Embryo v osembunkovom štádiu využíva ako primárny zdroj energie glukózu, ktorá je kľúčovým anabolickým prekursorom a je potrebná na syntézu triacylglycerolov a fosfolipidov a prekursorom pre komplexné cukry a glykoproteíny (Trávník a kol. 2022).

2.5.5 Vitamíny

Pre vývoj embrya majú zásadný význam vitamíny skupiny B – najmä B₂, B₆, B₉ a B₁₂. Najväčší význam má kyselina listová, ktorá sa zúčastňuje dvoch dôležitých metabolických dráh – syntéza thymínu a recyklácia homocysteínu (Trávník a kol. 2022). Mierne dávky vitamínov C a E znižujú oxidačné poškodenie embryí a zlepšujú vývoj blastocysty (Gruber a kol. 2011). Pridanie kyseliny askorbovej do kultivačného média významne ovplyvňuje vývoj embrya a vitamín E chráni bunky pred kyslíkovými radikálmi *in vivo* a *in vitro*. Ukázalo sa, že pridanie vitamínu E do kultivačného média zvyšuje rýchlosť vývoja blastocysty *in vitro* (Wang a kol. 2002).

2.5.6 Makromolekuly

Tekutina v reprodukčnom trakte je bohatá na makromolekuly. Bežnými makromolekulami sú proteíny pridávané do kultivačných médií (Gruber a kol. 2011). Proteíny slúžia ako zdroje energie a sú rezervoárom k uvoľneniu hormónov, vitamínov a kovov (Simon a kol. 2003). Najčastejšie sa pridáva ľudský sérový albumín (HSA) alebo syntetické sérum. Obe sa pridávajú v koncentráciách 5 – 20 %. Albumín udržiava stabilitu bunkových membrán a pôsobí chelatačne na stopové množstvá toxických zložiek. Medzi jeho ďalšie funkcie patrí kapilárna membránová permeabilita a osmoregulácia (Gruber a kol. 2011). Okrem iného má dobré fyzikálne vlastnosti – pôsobí lubrikačne a je viskózne, čo umožňuje ľahkú manipuláciu s embryom a bráni jeho priľnutiu ku kultivačnej miske. Niektoré makromolekuly ako polyvinylpyrolidón (PVP) a polyvinylalkohol (PVA) či kyselina hyalurónová, boli navrhnuté ako možné alternatívy (Simon et al. 2003). Avšak PVP ani PVA nie je považovaný za fyziologickú alternatívu proteínov, nakoľko ich teratologické vlastnosti neboli preskúmané a vyvolávajú obavy týkajúce sa ich používania v asistovanej reprodukcii (Simon a kol. 2003).

Makromolekula, ktorá je prítomná vo zvýšenom množstve v reprodukčnom trakte, je hyaluronan. Hyaluronan je lineárny polysacharid – glykosaminoglykán, prítomný v cervikálnom hliene, kumulo-oocytárnom komplexe (COC), folikulárnej tekutine a seminálnej

plazme. Množstvo tejto makromolekuly prítomnej aj vo vajcovodoch a maternici sa zvyšuje až do času implantácie (Valojerdi a kol. 2006).

Ukázalo sa, že hyaluronan má významnú úlohu v kultivačných médiách embryí. Hyaluronan môže nahradiť albumín, ale významnejšie sa ukázalo pridanie hyaluronanu do kultivačného média, ktoré obsahuje albumín, čo výrazne ovplyvnilo vývoj embryí, a zlepšilo tiež prežívanie embryí po vitifikácii. Nedávna randomizovaná štúdia potvrdila, že zvýšenie hladín hyaluronanu zvýšilo implantačnú mieru a úspešnosť tehotenstva (Gardner a kol. 2007).

2.5.7 Rastové faktory

Embryá sú prirodzene vystavené komplexnej zmesi rastových faktorov, ktoré majú kľúčovú úlohu v raste a diferenciácii v čase prechodu zo štádia moruly do štádia blastocysty (Gruber a kol. 2011). Štúdie poukazujú na fakt, že kultivácia embryí *in vitro* v kultivačnom médiu bez rastových faktorov môže viesť k suboptimálnemu rastu a rôznym či už krátkodobým, alebo dlhodobým vývojovým abnormalitám. Prítomnosť rastových faktorov tak môže zlepšiť vývoj *in vitro* (Richter, 2008).

2.5.8 pH kultivačného média a oxid uhličitý

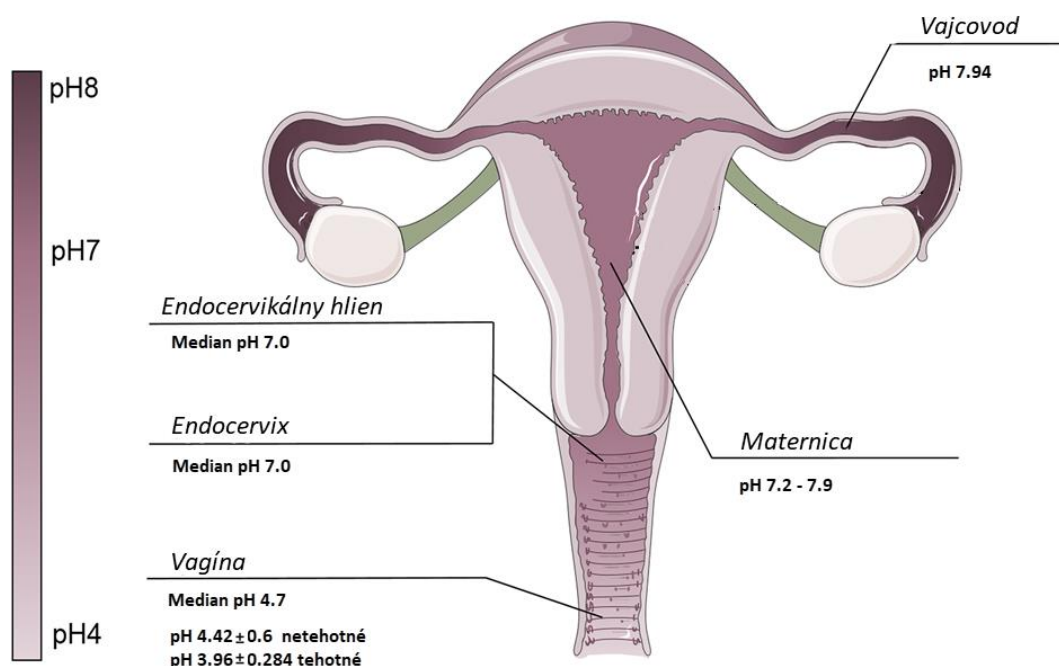
Dôležitým parametrom počas kultivácie embryí je pH kultivačného média. Komplexná funkcia, ktorá je závislá od prítomnosti pufrův v roztoku, ktoré interagujú s CO₂ v plynnej fáze (Hentemann et al. 2011). Primárna interagujúca zložka je hydrogénuhličitan sodný (NaHCO₃). Ich vzťah je vyjadrený Henderson – Hasselbachovou rovnicou:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{HCO}_3^-}{\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2} \quad (\text{Quinn, 2004}).$$

Spermie prechádzajú od epididymidis do vajčkovodu prostredím s rozdielnymi pH. V epididymidis je pH okolo 6,8, po zmiešaní všetkých zložiek ejakulátu sa spermie následne ocitnú v prostredí s pH 7,2 – 8,4, vo vagíne je hodnota pH asi 4,4 a v endocervixe a maternici asi 7 (Trávník a kol. 2022).

Regulácia koncentrácie CO₂ je najdôležitejšou časťou inkubátora, nakoľko reguluje pH kultivačného média. Hodnota pH je výsledkom koncentrácie CO₂ a množstva bikarbonátov v kultivačnom médiu. Molekuly CO₂ sa v kultivačnom médiu rozpustia a dochádza k produkcii kyseliny uhličitej, ktorá má tendenciu dosiahnuť rovnováhu s rozpusteným

hydrgénuhlíčitánom. Čím je koncentrácia CO₂ vyššia, tým nižšie je pH média (Lundin a kol. 2021). Prijateľný rozsah pH pre kultivačné médiá embryí je v rozsahu 7,4 – 7,2. V priebehu rokov sa aplikovalo pH 7,4 ako zlatý štandard pre manipuláciu s ľudskými gamétami a embryami (Hentemann a kol. 2011). Ak sa používajú médiá, ktoré sú sytené CO₂, je nevyhnutné minimalizovať čas misky mimo inkubátora, čím sa zabráni zvyšovaniu pH. Prekrývanie kultivačných médií minerálnym olejom znižuje rýchlosť znižovania CO₂ a následné zvyšovanie pH (Gardner a kol. 2013).



Obrázok 3 Rozdiely v pH v ženskom reprodukčnom systéme (upravené podľa Ng a kol. 2018).

2.5.9 Kyslík

Kyslík sa považuje za sekundárny stresový faktor pri kultivácii embryí. V súčasnej dobe je odporúčaná koncentrácia kyslíka 5 % počas kultivácie embryí *in vitro* (Cairo Consensus Group, 2020). Koncentrácia 5 % O₂ v porovnaní s okolitou atmosférou vykazuje pravidelnejšie delenie embryí a vývoj blastocýst *in vitro*. Tieto kultivačné podmienky viedli k prvému živému pôrodu po IVF. Koncentráciu kyslíku v inkubátore je možné regulovať prídávaním dusíku (Khoudja a kol. 2013, Kersti a kol. 2021).

2.5.10 Teplota

Teplota v inkubátore je kritickým faktorom, ktorý ovplyvňuje vývoj preimplantačného embrya v *in vitro* a môže ovplyvňovať pH média (Youssef a kol. 2016). Embryá rastú pri teplote tela 37 °C a zníženie teploty o 1 °C môže narušiť deliace vretienko, ktoré pomáha rozdeľovať chromozómy (Talwar a kol. 2012). Randomizovaná štúdia sa zamerala na kultiváciu embryí počas 5 – 6 dní pri teplote 36 °C a 37 °C. Štúdia preukázala, že pri kultivácii 37 °C majú embryá priemerne vyšší počet buniek na tretí deň a lepšiu kvalitu blastocýst v porovnaní s teplotou 36 °C (Cairo Consensus Group, 2020).

2.6 Preimplantačné genetické testovanie (PGT)

Výber najlepšieho embrya na prenos je dôležitým krokom v celom procese IVF. V súčasnej dobe sa vyberá embryo na základe hodnotiaceho systému zameraného na morfológiu embrya. Pozoruje sa čas prvého rozdelenia blastomér, ich symetria, a hodnotí sa prítomnosť bunkových fragmentov. V štádiu blastocysty sú hodnotené parametre ako kompaktnosť embryoblastu, vzhľad trofektodermy a vnútorná bunková hmota (Abeyta a kol. 2014).

Na posúdenie kvality embrya sa využívajú rôzne neinvazívne metódy ako je časozberné zobrazovanie morfokinetiky embryí, proteomické či metabolomické štúdie. Predĺžená kultivácia embrya do štádia blastocysty však stále vykazuje významné riziko aneuploidie. Viaceré štúdie preukázali, že najväčším dôvodom zlyhania IVF je prítomná aneuploidia, čím sa zvyšuje význam preimplantačného genetického testovania aneuploidií (PGT-A) ako metóda na selekciu chromozómálne zdravých embryí (Dahdouh a kol. 2015a).

Preimplantačné genetické testovanie je v súčasnej dobe vo veľkej miere využívané v IVF centrách po celom svete k selekcii euploidných embryí na prenos a zlepšenie klinických výsledkov, v rámci implantácie embrya, klinického tehotenstva a živého pôrodu (Greco a kol. 2020).

Táto technika bola vyvinutá v 80. rokoch 20. storočia, kedy sa k určovaniu pohlavia embryí, u pacientov nesúcich X – viazané poruchy, využívala technika PCR.

Indikácie pre PGT v procese IVF zahŕňajú: vek matky, opakované implantačné zlyhanie, opakované spontánne potraty, závažná mužská neplodnosť, monogénne ochorenia či štruktúrne chromozómové prestavby (Dahdouh a kol. 2015b).

Preimplantačné genetické testovanie zahŕňa:

- a) PGT-A: preimplantačné genetické testovanie zamerané na aneuploidie.
- b) PGT-SR: preimplantačné genetické testovanie zamerané na štruktúrne chromozómové prestavby.
- c) PGT-M: preimplantačné genetické testovanie zamerané na monogénne ochorenia (Zegers-Hochschild a kol. 2017).

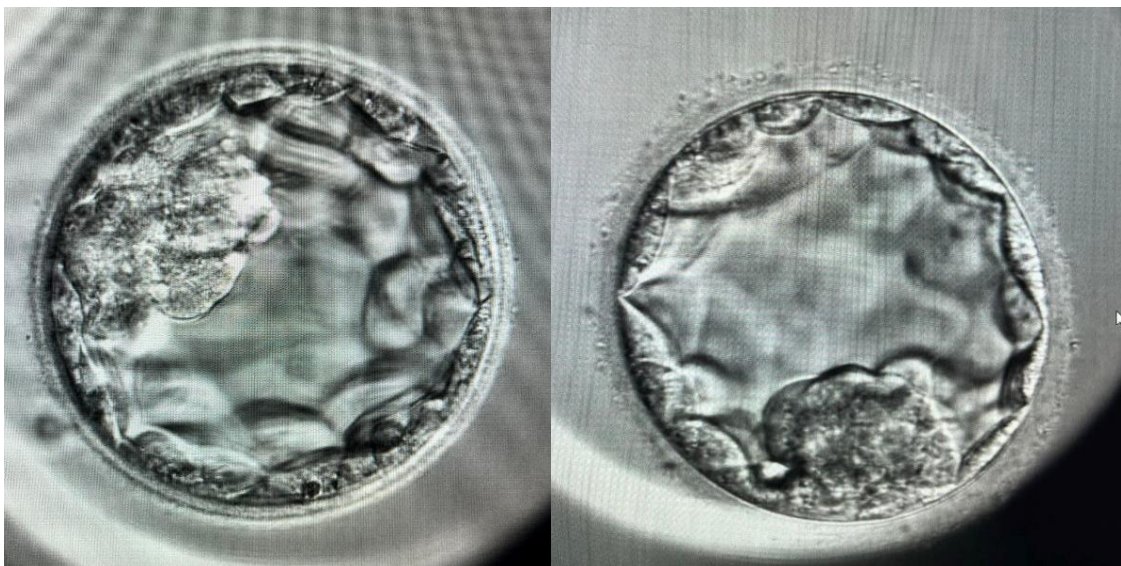
2.6.1 Preimplantačné genetické testovanie zamerané na aneuploidie

Preimplantačné genetické testovanie zamerané na aneuploidie je technika, pri ktorej sa skúma všetkých 46 chromozómov (<https://ormgenomics.com/2018/09/20/pgt-what-does-it-all-mean/>).

Embryonálne chromozómové abnormality sú najčastejšou príčinou potratov, ktoré sa vyskytujú až v 60 % spontánnych potratov. Môžu sa vyskytnúť chromozómové abnormality, ktoré zahŕňajú aneuploidiu. Týka sa to straty chromozómu – monozómia, adícia chromozómu – trizómia, adícia celej sady chromozómov – triploidia, alebo štrukturálne zmeny v rámci chromozómu. Využitie PGT-A sa za posledné roky výrazne zvýšilo s cieľom dosiahnuť čo najvyšší úspech pri transfere embrya (Bonus a kol. 2022).

PGT-A bolo zavedené prvýkrát v roku 1993 na selekciu euploidných embryí k zlepšeniu výsledku asistovanej reprodukcie.

V počiatkoch bola analýza prevedená pomocou fluorescenčnej hybridizácie in situ, ktorá analyzovala len znížený počet chromozómov. Potreba skúmať stav ploidity embryí viedla k vývoju rôznych techník k analýze celého chromozómového panelu, ako napríklad Array-Comparatívna genomická hybridizácia, sekvenovanie novej generácie (NGS) a kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (Greco a kol. 2020).



Obrázok 4 Porovnanie morfokinetických znakov euploidného a aneuploidného embrya (Gynicare, 2023).

2.6.2 Preimplantačné genetické testovanie zamerané na štruktúrne chromozómové prestavby

Preimplantačné genetické testovanie štruktúrnych chromozómových prestavieb je genetické testovanie embryí, ktoré vznikli v procese IVF. Testujú sa chromozomálne štruktúrne preskupenia, ktoré sú spôsobené vyváženými translokáciami, inverziami, duplikáciami a deléciami (<https://pacgenomics.com/pgt/pgt-sr/>).

Translokácie sú definované ako preskupenia chromozómových segmentov medzi nehomologickými chromozómami a vyskytujú sa približne u 1 z 500 jedincov. Robertsonove translokácie majú abnormálne zlomy a dochádza k spojeniu dvoch akrocentrických chromozómov (Bartels a kol. 2020).

Výsledkom je abnormálny počet chromozómov - 45 namiesto normálneho počtu - 46. Najčastejšie pozorované Robertsonove translokácie sú medzi chromozómami 13/14 a 14/21 (<https://pacgenomics.com/pgt/pgt-sr/>).

Translokácie medzi chromozómami 13 a 14 sú spojené s niektorými klinickými prejavmi vrátane mužskej neplodnosti a rekurentnej straty tehotenstva (Tunç a kol. 2022). Reciproké translokácie, ktoré sú bežnejšie, majú vymenené koncové segmenty na chromozómoch (Bartels a kol. 2020). K identifikácii translokácie ako príčiny rekurentných strát tehotenstva došlo až v roku 1962, keď pán Schmid prvýkrát charakterizoval dedičnú translokáciu u páru s viacnásobnými stratami tehotenstva (Morin a kol. 2017).

Problém balancovanej translokácie nastáva v prípade reprodukcie, kedy môžu vzniknúť vajíčka alebo spermie, ktoré neobsahujú správne množstvo genetického materiálu. Ak dôjde k oplodneniu takouto spermiou alebo vajíčkom, vznikne geneticky abnormálny jedinec s mnohopočetnými vývojovými vadami a ťažkými orgánovými postihnutiami. Vo väčšine prípadov je plod samovoľne potratený, alebo je vývojová vada odhalená v rámci prenatalnej diagnostiky (<https://www.repromeda.sk/poskytovana-starostlivost/genetika/pgd-preimplantacna-geneticka-diagnostika/pgt-t-translokacie/>).

Veľká štúdia v Quebecu odhaduje, že translokácia je prítomná u 2,2 % párov po jednom potrate, u 4,8 % párov po dvoch potratoch a u 5,7 % párov po troch potratoch (Braekeleer a kol. 1990).

2.6.3 Preimplantačné genetické testovanie zamerané na monogénne ochorenia

Preimplantačné genetické vyšetrenie zamerané na monogénne ochorenia je čoraz viac populárnejšia technika, ktorá umožňuje postihnutému páru predísť prenosu ochorenia, ktoré je prenášané poruchou jedného génu z rodičov na potomka (Lee a kol. 2020).

Je to metóda, ktorá umožňuje výber tzv. „zdravého“ embrya bez konkrétnej genetickej záťaže. Pre túto metódu je nevyhnutné podstúpiť umelé oplodnenie a následné genetické vyšetrenie embrya pred prenosom do maternice matky (<https://www.repromeda.cz/poskytovana-pece/genetika/preimplantacni-geneticka-diagnostika/pgd-monogennich-chorob/>).

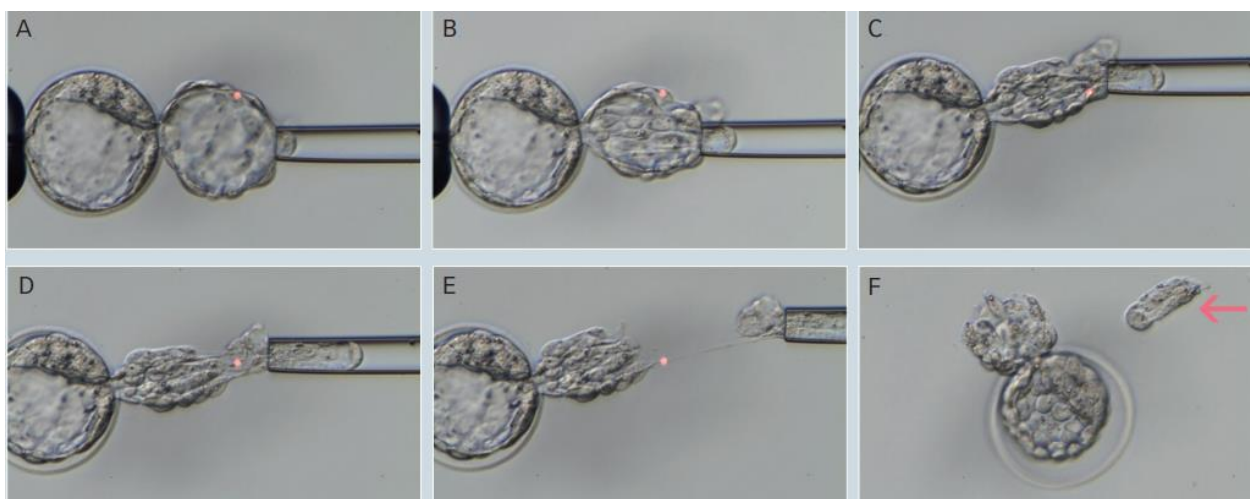
Táto technika bola prvýkrát aplikovaná v roku 1990 v prípade X-viazanej adrenoleukodystrofie a následne ďalší rok v prípade cystickej fibrózy (Lee a kol. 2020).

Medzi bežné indikácie pre PGT-M radíme vzácne ochorenia ako cystickú fibrózu, spinálnu muskulárnu atrofiu, Huntingtonovu chorobu, metabolické poruchy, neurofibromatóza, Marfanov syndróm, familiárna hypercholesterolémia, syndróm fragilného X, syndróm svalovej dystrofie a ďalej dedičné dispozície k nádorovým ochoreniam napr. BRCA1 a BRCA2. V súčasnej dobe sa však indikácie naďalej rýchlo rozširujú (<https://www.repromeda.cz/poskytovana-pece/genetika/preimplantacni-geneticka-diagnostika/pgd-monogennich-chorob/>).

2.6.4 Biopsia

Biopsia na analýzu sa môže urobiť odobraním prvého a/alebo druhého pólóvého telieska oocyty, z embrya v cleavage štádiu, odbioptovaním niektorých blastomér z embrya, alebo zo štádia blastocysty odobratím niektorých buniek trofektodermu. Tieto techniky je možné použiť pri rôznych indikáciách, pri ktorých by prenos euploidného embrya mohol zlepšiť klinické výsledky (Greco a kol. 2020).

Biopsia v štádiu blastocysty poskytuje väčší počet buniek pre genetické testovanie, čím dochádza k zvýšeniu spoľahlivosti a minimalizovaniu rizika diagnostickej chyby (Hui a kol. 2019).



Obrázok 5 Priebek biopsie (upravené podľa Costa-Borges et al. 2016).

Priebek biopsie začína na tretí deň kultivácie, kedy sa pomocou použitia laseru urobí 10 mm otvor v *Zona Pellucida*. Následne sa embryá naďalej kultivujú v kultivačnom médiu. Na piaty eventuálne šiesty deň sa embryo vloží do kvapky média prekrytého minerálnym olejom. Embryo sa drží pomocou mikromanipulačného nástroja Holderu skrz ZP v oblasti viditeľnej vnútornej masy. Na druhej strane sa do bioptickej ihly nasajú bunky trofektodermu. Pomocou laseru sa následne odstráni 5 – 10 buniek trofektodermu, ktoré vyliezli zo svojho obalu (Rubino a kol. 2020).

Odbioptované bunky trofektodermu sa umiestnia do mikrocentrifugačných skúmaviek po sérii niekoľkých premytí premývacím roztokom, a následne sa mrazia pri mrazničkovej teplote (Kaye a kol. 2018).

2.7 Analýza kultivačného média

Použitie kultivačné médium (Spent blastocyst medium, SBM) môže poskytovať dôležité informácie, ktoré sa týkajú fyziologického stavu embryí pred implantáciou embrya prostredníctvom neinvazívnej analýzy genomických, transkriptomických, metabolomických zložiek. Omické metódy sa v súčasnosti stávajú doplnkovou technikou k morfológickému hodnoteniu rýchlosti delenia, a samotného chápania vývoja embrya (Perkel a kol. 2017).

Embryá majú schopnosť vylučovať do extracelulárneho prostredia látky, tzv. sekretómy, ktoré by mohli spĺňať vlastnosti potenciálnych biomarkerov. Kultivačné médium je v procese *in vitro* fertilizácie extracelulárnym prostredím pre embryá. Ideálny embryonálny biomarker by mal vykazovať základné vlastnosti ako sú neinvazívnosť, stabilita, špecifickosť k embryu a ľahká detekcia.

Kultivačné médium, v ktorom sa kultivujú embryá, predstavuje neinvazívny spôsob odberu biologického materiálu. SBM sa v súčasnosti používa postupne aj v rutinej oblasti k štúdiu nových biomarkerov vhodných pre hodnotenie ploidity, kvality a viability embrya (Klepcová a kol. 2021).

2.7.1 Malé nekódujúce RNA

Bunky a tkanivá, ktoré sú súčasťou reprodukčných procesov sú jedinečné, pretože neustále prechádzajú reorganizáciou počas gametogenézy a embryogenézy na transkriptomickú a proteomickej úrovni. Nedávno sa vedci začali zameriavať na bunkovú proteomiku, ktorá zahŕňa malé nekódujúce RNA (Timofeeva a kol. 2019).

Malé nekódujúce RNA molekuly sú krátke molekuly, ktoré majú približne 22 nukleotidov a majú vzájomnú sekvenančnú podobnosť, tkanivovú špecifitu a veľký dynamický rozsah (Klepcová a kol. 2021). Najdôležitejšiu úlohu medzi týmito molekulami majú mikroRNA (miRNA) a piwi – interagujúce RNA (piRNA) (Timofeeva et al. 2019).

V predchádzajúcich rokoch je venovaná pozornosť úlohe malých nekódujúcich RNA pri implantácii embrya a jeho normálnom vývoji v súvislosti s ich účinkom na transkripčnej a posttranskripčnej úrovni regulácie génovej expresie, čím môžu mať vplyv na celé spektrum procesov v reprodukčnom systéme (Klepcová a kol. 2021).

2.7.1.1 Malé nekódujúce RNA v kultivačnom médiu blastocysty

Mnoho štúdií sa zaoberá úlohou malých nekódujúcich RNA, vrátane piRNA a miRNA v reprodukčnom systéme. Ľudské embryá sú schopné secernovať špecifické piRNA a miRNA molekuly do extracelulárneho prostredia, a umožniť tak interakciu medzi blastocystou a endometriom, čo odráža životaschopnosť embrya, ploidiu ako aj implantačný potenciál (Toporcerová a kol. 2022).

2.7.2 Piwi-interagujúce RNA

PiRNA sú novou triedou nekódujúcich malých jednovláknových RNA, ktoré majú dĺžku 24 – 31 nukleotidov a sú hojne zastúpené v zárodočnej línii. Predchádzajúce štúdie ukázali, že piRNA majú rozhodujúcu úlohu v gametogenéze, epigenetickej regulácii, vývoji zárodočnej línie, regulácii génovej expresie a embryonálnom vývoji (Sari a kol. 2020, Yuka a kol. 2015). PiRNA majú dôležitú úlohu pri umlčaní transpozónov, čím sa zabezpečí normálna gametogenéza a reprodukcia (Toporcerová a kol. 2022).

PiRNA delíme do troch tried podľa sekvenovania novej generácie. PiRNA trieda I sú produkované zoskupením genetických lokusov. Štiepenie cieľovej transpozónovej RNA je sprostredkované piwi proteínom piRNA II. triedy. Posledná skupina piRNA pochádza z rôznych génomových oblastí. To poukazuje na to, že piRNA môžu regulovať úroveň génovej expresie. Model amplifikácie piRNA a neutralizácia transpozónov sa vyskytujú prostredníctvom ping-pongového mechanizmu v zárodočných bunkách (Timofeeva a kol. 2019).

Proteíny, ktoré sú zapojené do biogenézy a funkcie piRNA, sú rozhodujúce pre biogenézu a správne fungovanie piRNA. Ak dôjde k defektom vo funkcii alebo expresii týchto proteínov, môže byť ovplyvnená funkcia alebo produkcia piRNA. Viaceré štúdie potvrdili, že defektná expresia génov v biogenéze piRNA môže viesť k neplodnosti, dysfunkcii gamét a zvýšenej akumulácii retrotranspozónových transkriptov (Sari a kol. 2020).

2.7.2.1 Vybrané piRNA v kultivačnom médiu ako potenciálny biomarker

PiRNA molekuly spolu s piwi proteínmi majú dôležitú úlohu pri vývoji zárodočných buniek, a sú priamo spojené s plodnosťou u oboch pohlaví. Nedávne štúdie poukázali na rôzne úrovne expresie molekúl piRNA z SBM z hľadiska morfológického stupňa embrya a jeho implantačného potenciálu. Samotné molekuly nemajú významnú predikčnú schopnosť, ale ako komplex sú citlivým prediktívnym biomarkerom (Toporcerová a kol. 2022).

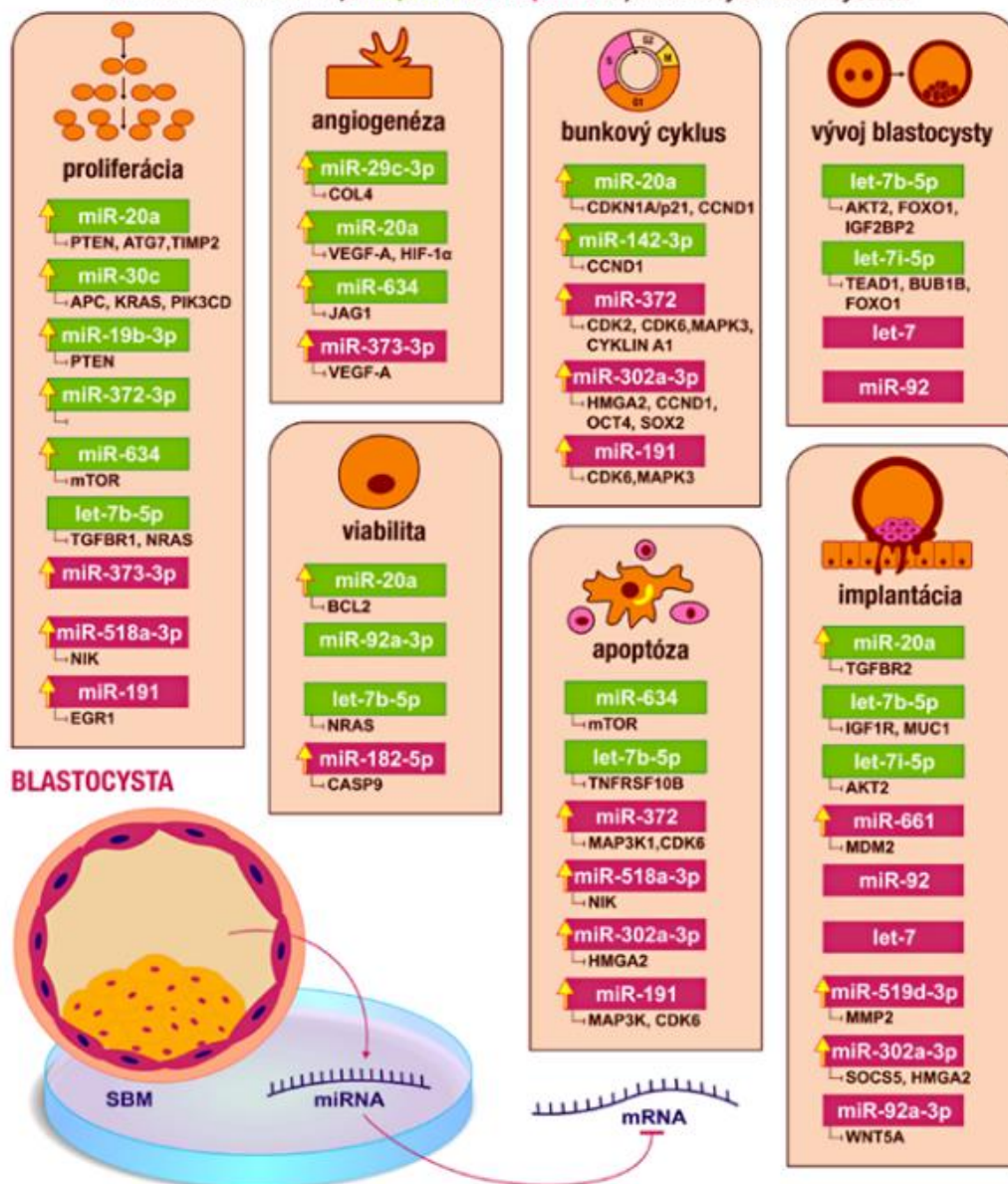
2.7.3 MikroRNA

MikroRNA sú malé nekódujúce RNA, ktoré majú priemernú dĺžku 22 nukleotidov, regulujú génovú expresiu mnohých proteínov a podieľajú sa na širokej škále biologických procesov ako je bunková proliferácia, diferenciácia a apoptóza, vrátane skorého vývoja embryí (Bartošík a Jiráková, 2018). MikroRNA sú zabalené do malých vezikúl, nazývané exozómy, a následne sú vylučované do extracelulárneho prostredia. Zapuzdrené miRNA sú chránené pred degradáciou, a preto môžu byť detegované aj po dlhšom čase (Rosenbluth a kol. 2014).

MikroRNA sú vysoko exprimované v rýchlo rastúcich nediferencovaných bunkách, ako sú rakovinové bunky a embryonálne kmeňové bunky a nakoľko sú miRNA secernované do extracelulárneho prostredia, môže ich detekcia slúžiť ako prediktívny biomarker viability embrya (Rosenbluth a kol. 2013).

Viacero autorov porovnávalo zmeny v expresii miRNA v SBM u blastocýst, ktoré sa implantovali s blastocystami, u ktorých došlo k zlyhaniu implantácie. Obr. 6 poukazuje na zoznam týchto markerov (Klepcová a kol. 2021).

Efektorové mikroRNA pri úspešne a neúspešne implantovaných blastocystách



Obrázok 6 Vybrané miRNA z kultivačného média blastocýst a ich cieľové gény.

MikroRNA izolované z kultivačného média blastocýst, ktoré ovplyvňujú expresiu génov a sú súčasťou na rôznych bunkových procesov, súvisiace s embryogenézou a implantáciou - proliferácia, angiogenéza, prežívania, apoptóza, proces samotnej implantácie embrya do maternice alebo v preimplantačnom vývoji (zvýšená expresia je znázornená šípkou hore) (upravené podľa Klepcová a kol. 2021).

2.8 Vybrané molekulové metódy detekcie piRNA

Interpretácia morfológie embrya nie vždy odráža jeho fyziológiu a viabilitu. Boli navrhnuté rôzne biomarkery kvality embryí a ich implantačného potenciálu. Tieto metódy zahŕňajú neinvazívne metabolomické a proteomické profilovanie kultivačného média, v ktorom sa vyvíja embryo. Metabolomický profil však vyžaduje použitie veľmi citlivých nástrojov, ktoré dokážu detegovať aj mierne zmeny v zložení média, čo je rozhodujúce, nakoľko metabolomická aktivita embrya závisí od kultivačného média. Hodnotenie proteomického profilu embrya je zatiaľ nepresné, pretože je potrebné obohacovať médiá hlavnými exogénnymi proteínmi, ktoré zabezpečujú normálny vývoj embrya.

K analýze piRNA sa využívajú metódy, popísané v nasledujúcich kapitolách:

2.8.1 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je metóda *in vitro*, ktorá sa využíva k amplifikácii DNA a bola založená v roku 1985 Kary B. Mullisom. Všestrannosť a rýchlosť PCR spôsobili revolúciu v molekulárnej diagnostike a umožnili realizovať množstvo aplikácií, ktoré pred érou PCR neboli možné. PCR umožňuje získať požadovanú a špecifickú sekvenciu genómovej DNA bez toho, aby ju bolo potrebné vopred klonovať vo vektoroch.

Princíp PCR je založený na replikácii nukleových kyselín (NK), ktorá je základným molekulárnym procesom všetkých živých organizmov. Podstata PCR je opakujúca sa enzýmová syntéza nových reťazcov vybraných úsekov dvojreťazcovej DNA v smere 5' → 3' prostredníctvom DNA-polymerázy. Úsek nukleotidovej sekvencie je vymedzený pripojením dvoch primérov, ktoré sa viažu na protíahlé reťazce DNA tak, že ich 3' – konce smerujú proti sebe. Po pridaní DNA-polymerázy a nukleotidov následne prebieha syntéza nových vlákien na oboch matricových reťazcoch protismerne. K syntéze DNA sa používajú termostabilné polymerázy izolované z termofilných mikroorganizmov, napr. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus*, ktorý odoláva teplotám, pri ktorých DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA prebiehala cyklicky. V závislosti na teplote reakčnej zmesi sa pravidelne striedajú tri kroky, počas ktorých prebiehajú tri odlišné deje s odlišnými nárokmi na teplotu (Šmarda a kol. 2005).

1. Denaturácia

Roztok v skúmavke sa zahreje na 94 °C pomocou termocykléra. Teplota rozrušuje vodíkové väzby pôvodnej vzorky DNA a rozdelí DNA na jednotlivé vlákna – dôjde k denaturácii dvojvláknovej DNA.

2. Anelácia (hybridizácia)

Zmes vzoriek sa následne ochladí na teplotu medzi 50 – 60 °C, čo umožní DNA primérom a DNA - polymeráze naviazať sa na jednotlivé vlákna DNA, ktoré boli v predchádzajúcom kroku rozvoľnené vplyvom teploty. V tomto bode sa nukleotidy z pridaného roztoku zmesi spárujú s jednotlivými oddelenými vláknami DNA, ktoré sú výsledkom procesu zahrievania.

3. Polymerizácia (elongácia)

V momente keď dôjde k ich naviazaniu, vytvorí sa nové komplementárne vlákno DNA. Z jednotlivých reťazcov pôvodnej molekuly vzorky sa vytvorí nová duplicitná molekula dvojvláknovej DNA. Teplota sa pohybuje medzi 65 – 75 °C. (<https://www.coleparmer.com/tech-article/pcr-process-steps-explained>).

Reakcie sa vykonávajú v zariadení, ktorý sa nazýva termocyklér, v ktorom sa teplota mení automaticky v naprogramovaných časových intervaloch. Postupným opakovaním procesu sa exponenciálne vytvára až miliarda kópií vybraného úseku cieľovej molekuly (Šmarda a kol. 2005).

Číslo cyklu	Počet syntetizovaných molekúl produktu
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16384
17	32768
18	65536
19	131072
20	262144
21	524288
22	1048576
23	2097152
24	4194304
25	8388608
26	16777216
27	33554432
28	67108864
29	134217728
30	268435456
31	536870912
32	1073741824

Obrázok 7 Teoretická amplifikácia cieľového fragmentu DNA pri zvyšujúcom sa počte cyklov (upravené podľa Šmarda a kol. 2005).

2.8.1.1 Kvantitatívna PCR (q-PCR)

Pri tomto postupe je amplifikované známe množstvo kompetitívneho templátu spolu s rovnakými množstvami cieľovej DNA. Kompetitívny templát obsahuje rovnaké sekvencie pre väzbu primérov ako cieľová DNA s rozdielnou veľkosťou. QPCR má široké využitie v klinickej diagnostike pri genotypizačnej analýze bodových mutácií, deléciách alebo chromozómových aberáciách.

V súčasnej dobe sa využíva modifikácia PCR, ktorá umožňuje priamu kvantifikáciu PCR produktu v priebehu reakcie. Kvantifikácia množstva molekúl NK je dôležitá pri detailnom štúdiu génovej expície alebo diagnostike niektorých patogénov. Kvantifikácia amplikónu pri q-PCR v reálnom čase sa vykonáva prostredníctvom detekcie a kvantifikácie fluorescenčného signálu v špeciálnom zariadení, ktoré okrem cyklického striedania teplôt umožňuje fluorescenčnú detekciu a monitorovanie postupu PCR v reálnom čase bez nutnosti detegovať produkty PCR elektroforeticky (Šmarda a kol. 2005).

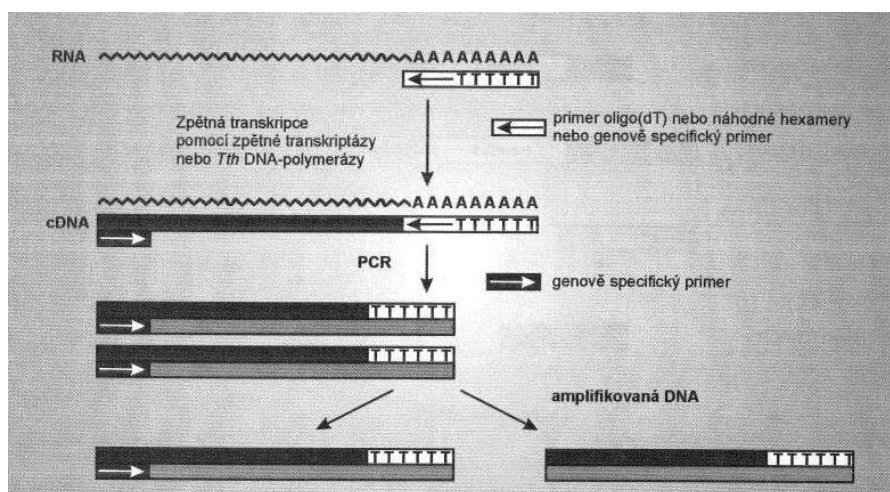
Kvantitatívna PCR používa fluorescenčné farbivá a optický systém počas každého PCR cyklu zaznamenáva ich emitovanú fluorescenciu. Zaznamenaná fluorescencia sa softvérovým spracuje a vyhodnotí. Grafický priebeh real – time PCR znázorňuje amplifikačná krivka, ktorá má 4 fázy:

- 1) Fáza I – počas tejto fázy dochádza k zdvojnásobeniu množstva amplikónu po každom cykle, pričom nárast fluorescencie je pod detekčným limitom.
- 2) Fáza II – exponenciálna fáza – v tejto fázi sa fluorescencia zvyšuje na úroveň optickej detekcie, a cyklus, kedy začína táto fáza je dôležitý na určenie kvantity vstupného množstva templátovej DNA; označuje sa ako prahový cyklus (ct). Čím je Ct nižšie, tým väčší počet kópií templátovej DNA bol v reakcii.
- 3) Fáza III – lineárna fáza – vyznačuje sa postupnou spotrebou komponentov reakcie na narastajúce množstvo amplikónu.
- 4) Fáza IV – množstvo amplikónu sa už nezvyšuje v dôsledku vyčerpania zložiek qPCR (Pastoráková a Petrovič 2016).

2.8.1.2 PCR pomocou reverznej transkriptázy (qRT-PCR)

RT-PCR je metóda určená k amplifikácii molekúl RNA. RNA však nemôže slúžiť ako templát pre PCR, preto sa produkty tvoria iba vtedy, ak je izolovaná RNA prevedená do komplementárnej DNA (cDNA) retrovírovou spätnou transkriptázou víru M-MuLV a následne amplifikovaná PCR s dvomi špecifickými primérmí.

Nevýhodou spätnej transkriptázy je jej termolabilita. Enzým svoju funkčnosť stráca už pri teplotách nad 42 °C a preto je stringencia spätnej transkripcie RNA na cDNA relatívne nízka. Súčasná technika RT-PCR využíva termostabilnú Tth DNA-polymerázu, ktorá sa v prítomnosti Mn^{2+} vyznačuje RNA-dependentnou DNA-polymerázovou aktivitou a je schopná účinne a špecificky previesť RNA do DNA pri teplote 72 °C. Rovnaký enzým sa následne využíva pri PCR. Pre zahájenie RT-PCR sa využíva oligo(dT)-primer, ktorý je schopný rozoznávať poly(A)-koniec mRNA alebo náhodné hexanukleotidy v prípade, že mRNA nie je polyadenylovaná (Šmarda a kol. 2005).



Obrázok 8 Spätná polymerázová reakcia s využitím oligo(dT)-primeru (upravené podľa https://is.muni.cz/el/sci/podzim2010/Bi7015/um/enzymy_pro_MB.pdf)

2.8.2 Mikročipová analýza (Microarray)

Mikročipová analýza rýchlo a efektívne monitoruje transkripciu alebo priamo expresiu mnohých génov v jednej vzorke (Križanová 2012). Táto technika využíva hybridizáciu skúmanej NK s veľkým množstvom oligonukleotidových prób, ktoré sú prichytené na pevný podklad. Základom je najčastejšie čip – sklenený, nylonový alebo silikónový. Pozorovaná NK sa pred hybridizáciou fragmentuje, označí sa fluorofórom a dôjde k denaturácii. Princípom je hybridizácia značených oligonukleotidov s oligonukleotidovými sekvenciami, ktoré sú prichytené na čipe. Komplementárne nukleotidové sekvencie sa následne spájajú vodíkovými

mostíkmi a vytvoria tak nekovalentnú väzbu. Na základe fluorescencie sú detegované miesta, kde došlo k hybridizácii, čo znamená, že vzorka obsahovala nukleotidovú sekvenciu (Pastoráková a Petrovič 2016, Šmarda a kol. 2005). Microarray pomáha pri analýze veľkého množstva vzoriek, čím sa táto technika mikročipov stala metódou značne využívanou v dnešnej diagnostike (Govindarajan a kol. 2012).

2.8.3 Sekvenovanie

Cieľom sekvenovania DNA je stanovenie primárnej štruktúry, teda poradia nukleotidov v molekulách DNA. Sekvencia DNA sa používa rutinne k získaniu informácie o aminokyselinovej sekvencii kódovaných proteínov, o regulácii ich tvorby a umožňuje tiež stanoviť charakter mutácií, ktoré sa môžu prejaviť vznikom genetických ochorení (Šmarda a kol. 2005).

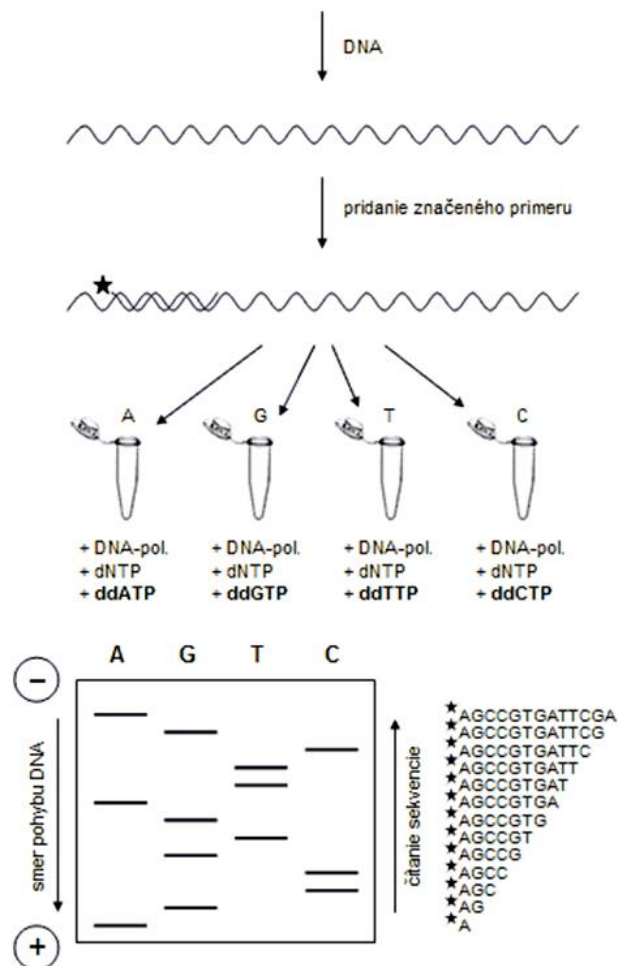
2.8.3.1 Sangerovo sekvenovanie

Enzýmová metóda sekvenovania je najbežnejšou metódou sekvenovania DNA. Vyvinula sa z techniky, ktorá sa označuje sekvenovanie +/-, kedy bolo prvýkrát využité predĺženie priméru DNA-polymerázou. Princípom sekvenovania je terminácia polymerizácie inkorporáciou 2', 3'- dideoxynukleotidov do novosyntetizujúceho sa vlákna DNA. Táto metóda využíva niektoré vlastnosti DNA-polymerázy: schopnosť vytvárať presné kópie molekuly DNA a schopnosť špecifickej syntézy reťazca DNA v smere 5' – 3' od priméru s voľnou 3'- OH skupinou (Šmarda a kol. 2005).

K reakcii dochádza v štyroch skúmavkách s rádioaktívne značeným priemerom. Každá reakcia je určená k stanoveniu relatívnej pozície špecifickej báze na konci analyzovaného reťazca. V každej skúmavke sa nachádzajú všetky štyri deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP), a v každej zo štyroch skúmaviek sa nachádza špecifický prídavok malého množstva jedného z dideoxynukleotidtrifosfátov (ddNTP). V prvej skúmavke sa nachádza ddATP, v druhej nájdeme ddCTP, v tretej skúmavke je ddTTP a v štvrtej sa nachádza malé množstvo ddGTP. Malé množstvo dideoxynukleotidtrifosfátov spôsobuje, že pri polymerácii najprv dôjde k zaradeniu štandardných dNTP do narastajúceho reťazca, čím sa len niekedy inkorporuje ddNTP, a tým dôjde k zastaveniu syntézy reťazca. V každej skúmavke vzniká populácia rôznych veľkostí, ktoré sú zakončené konkrétnym ddNTP. Vzniknuté fragmenty sa separujú

elektroforeticky v 4 dráhach polyakrylamidového gélu a autorádiografiou, a následne sa z autorádiogramu odčíta sekvencia (Pastoráková a Petrovič 2016).

V súčasnej dobe je sekvenovanie značne automatizované, pričom princíp Sangerovej metódy je zachovaný s malými zmenami. Používa sa termostabilná DNA – polymeráza, ktorou sa nasekvenuje úsek DNA a namnoží PCR metódou, po ktorej nasleduje sekvenačná reakcia s fluorescenčne značenými ddNTP. V tomto prípade prebieha sekvenačná reakcia iba v jednej skúmavke s jedným primerom, a vznikne tak súbor jednovláknových DNA s rôznou dĺžkou, ktoré majú na konci 3' označené miesta ddNTP so špecifickým fluorescenčným farbivom. Sekvencia DNA sa získava po kapilárnej elektroforéze vzorky, zaznamenávaní fluorescencie jednotlivých fragmentov CCD kamerou a následným softvérovým spracovaním (Šmarda a kol. 2005).



Obrázok 9 Sangerova metóda sekvenovania DNA (upravené podľa <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/sekvenovanie-dna>).

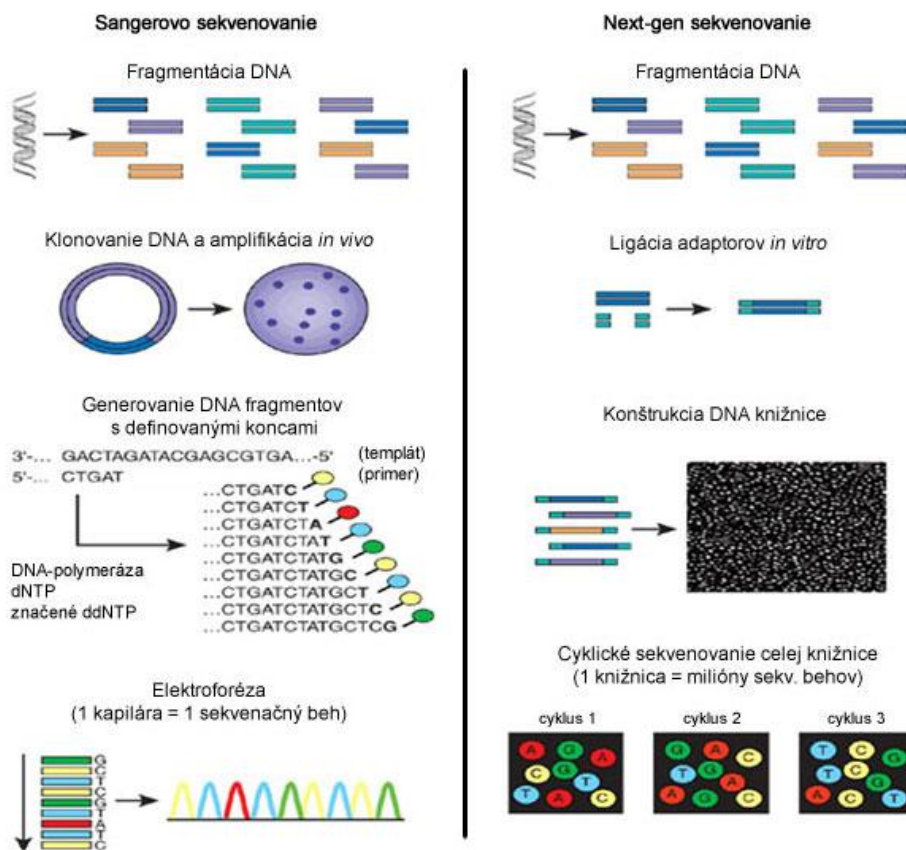
2.8.3.2 Sekvenovanie novej generácie

Sekvenovanie novej generácie je vysokovýkonná technika, ktorá umožňuje rýchle sekvenovanie párov báz vo vzorkách DNA a RNA. NGS umožňuje počítanie chromozómov, profilovanie génovej expresie, detekciu epigenetických zmien a molekulárnu analýzu (<https://www.thermofisher.com>). Pomocou NGS je možné sekvenovať celý ľudský genóm v priebehu jedného dňa (Behjati a kol. 2013).

Sekvenovanie „prvej generácie“, ktoré je založené na Sangerovej metóde, v súčasnej dobe nestačí na analýzu väčšieho množstva dát. V súčasnosti sa NGS technológie rozdeľujú do dvoch skupín. Prvá skupina je založená na PCR amplifikácii templátu – sekvenovanie druhej generácie. Druhá skupina je technológia bez nutnosti amplifikácie pred sekvenáciou – sekvenácia tretej generácie (Tomášová a kol. 2015).

2.8.3.3 Sekvenovanie druhej generácie

Princípom sekvenovania druhej generácie je tvorba krátkych fragmentov DNA, z prípravy templátu a následného vytvorenia knižníc amplikónov emulznou PCR alebo PCR v zhlukoch. Vo väčšine prípadov sa DNA najprv fragmentuje, čím vzniká DNA knižnica, na fragmenty sa pripoja krátke sekvencie a následne sa fragmenty amplifikujú a určí sa ich sekvencia. Sekvenovanie je založené na syntéze alebo ligácii adaptérových primérov s detekciou inkorporovaných nukleotidov a analýzou dát. Zo získaných sekvencií je možné vyskladať plynulú sekvenciu, ktorá zodpovedá pôvodnej nefragmentovanej DNA (Pastoráková a Petrovič 2016, Tomášová a kol. 2015). Výsledná DNA sekvencia sa porovnáva s referenčnou (Geryková Bujalková a kol. 2016).



Obrázok 10 Porovnanie I. a II. generácie sekvenovania (upravené podľa <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/sekvenovanie-novej-generacie>).

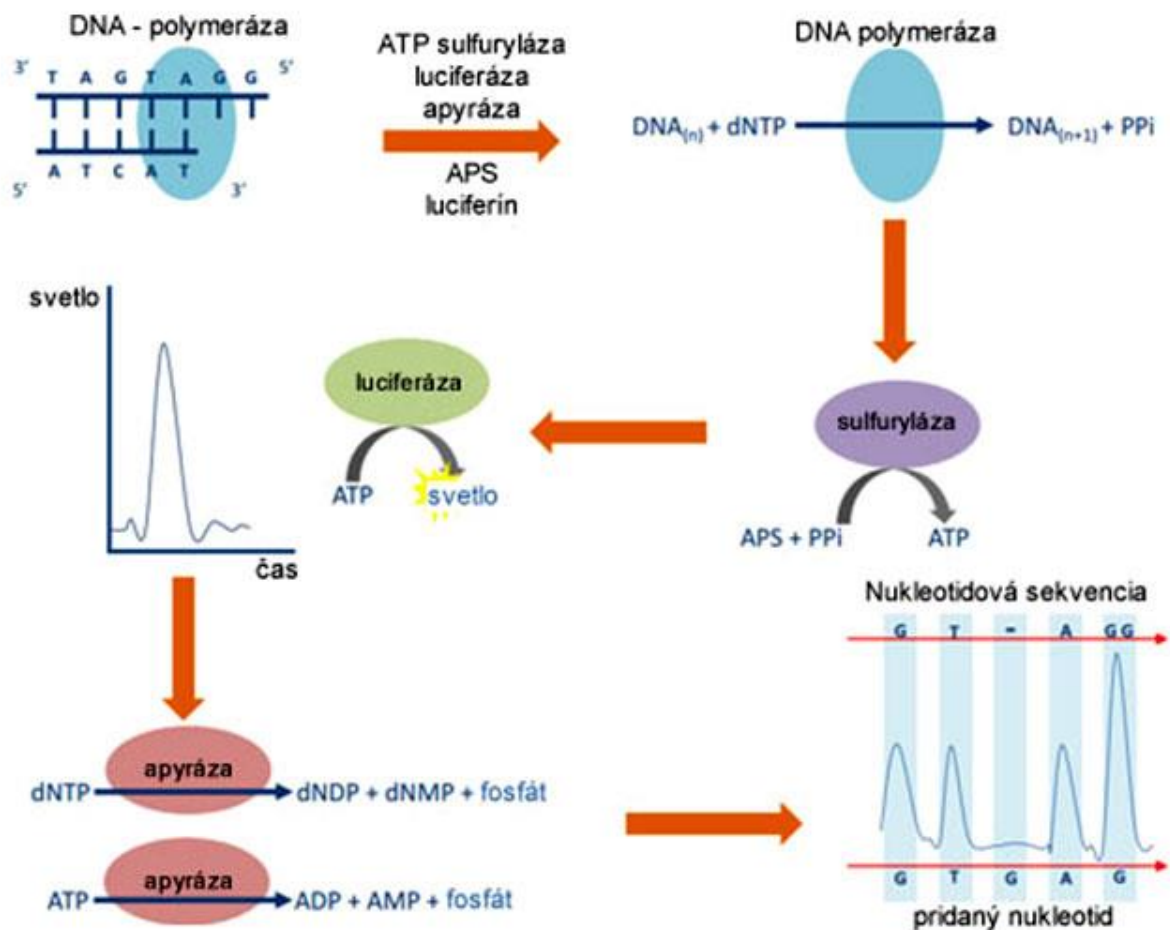
2.8.3.4 Sekvenovanie tretej generácie

Sekvenovanie tretej generácie nie je založené na namnožení sekvenovaných úsekov. Pri tejto metóde sa nevyužíva amplifikačný krok, čím sa znižuje výskyt spontánnych mutácií, ktoré môžu vzniknúť chybou DNA – polymerázy (Tomášová a kol. 2015). Sekvencia sa získava zachytením signálu v reálnom čase DNA (Pastoráková a Petrovič 2016).

2.8.3.5 Pyrosekvenovanie

Pyrosekvenovanie definujeme ako real-time sekvenovanie, pri ktorom sa v priebehu enzymatických reakcií deteguje svetelný - luminiscenčný signál, ktorý je uvoľnený pri zabudovaní dNTP do vznikajúceho reťazca DNA (<https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Pyrosequencing.aspx>).

Množstvo uvoľneného svetla by malo byť úmerné počtu začlenených nukleotidov. Pri pyrosekvenovaní sa uplatňujú 4 enzýmy – DNA polymeráza, ATP sulfuryláza, apyráza a luciferáza. Súčasťou reakčnej zmesi sú ďalšie komponenty – enzymatické substráty: adenozínfosfosulfát, sekvenovaný templát, d-luciferín a postupne pridávané nukleotidtrifosfáty. Hlavnou výhodou pyrosekvenovania je rýchlosť a dĺžka prečítanej sekvencie DNA (Pastoráková a Petrovič 2016, Tomášová a kol. 2015).



Obrázok 11 Princíp pyrosekvenovania (upravené podľa <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/sekvenovanie-novej-generacie>).

3 Cieľ práce

Cieľom práce bolo:

- Na základe literárnej rešerše uskutočniť prehľad možných exprimovaných nekódujúcich RNA molekúl v kultivačnom médiu embrya.
- Na základe literárnej rešerše popísať a vybrať vhodnú molekulovú metódu k analýze expresie nekódujúcich RNA molekúl v kultivačnom médiu embrya.
- V experimentalnej časti detekovať expresiu vybraných nekódujúcich RNA molekúl vybranou molekulovou metódou v kultivačnom médiu embrya a zhodnotiť ich potenciál pre hodnotenie kvality embrya v IVF procese.

4 Materiál a metodika

Experimentálna časť prebiehala v spolupráci s Centrom asistovanej reprodukcie GynCare v Košiciach a Univerzitou Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. Do štúdie boli zapojené pacientky, ktoré podstúpili *in vitro* fertilizáciu v GynCare.

Oocyty boli odobraté pacientkam v krátkodobej celkovej anestézii, ktoré následne prešli procesom *in vitro* oplodnenia. Embryá boli kultivované do štádia blastocysty a použité kultivačné médium bolo následne odpipetované, zamrazené a podrobené sekvenovaniu sncRNA. V procese odberu vzoriek sa odoberalo 20 μ l SBM z každej kultivačnej jamky jedného embrya. Odber SBM prebiehal sterilným spôsobom do mikroskúmaviek a následne boli vzorky skladované pri -70 °C.

Nasledujúca časť experimentu prebiehala na katedre biochémie lekárskej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. Metódy masívneho paralelného sekvenovania sncRNA boli vykonané na sekvenačnej platforme Illumina.

Celková RNA obohatená o malé RNA sa extrahovala zo zozbieraných SBM pomocou súpravy miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podľa protokolu výrobcu dodaného ku kitu. cDNA knižnice k sekvenovaniu ďalšej generácie sa pripravili pomocou súpravy QiaSeq miRNA Library Kit (Qiagen).

4.1 Pracovný postup izolácie ncRNA z SBM

Kultivačné médium bolo rozmrazené na ľade, pridané 350 μ l QIAzol a následne bola vzorka zvortexovaná. Vzorka bola inkubovaná 5 minút pri izbovej teplote. Ku každej vzorke bolo pridaných 90 μ l chloroformu. Vzorka bola premiešaná a inkubovaná 2 minúty pri izbovej teplote. Vzorku bolo následne potrebné centrifugovať 15 min 12000 g/4°C. Vrchná vodná fáza bola prepipetovaná do novej skúmavky a bol pridaný 1,5 násobok objemu 100% etanolu. Vzorka bola premiešaná a inkubovaná 2 minúty pri izbovej teplote. Obsah skúmavky bol prepipetovaný na kolónku RNeasy MinElute. Po centrifugácii bol odstránený filtrát a na kolónku bolo pridaných 350 μ l RWT. Filtrát bol následne po centrifugácii odstránený. 80 μ l DNázy v RDD bolo pridaných na kolónku, a následne bola vzorka inkubovaná 10 minút pri izbovej teplote. V ďalšom kroku bolo pridaných 350 μ l RWT a filtrát bol po centrifugácii odstránený. Ku vzorke bolo pridaných 500 μ l RPE. Filtrát bol následne po centrifugácii

odstránený a bolo pridaných 500 μ l 80% etanolu. Filtrát bol po centrifugácii opäť odstránený. Po vysušení sa eluovalo s 15 μ l nuclease-free vody. Vyizolovaná RNA bola následne skladovaná pri -80°C .

4.2 Príprava sekvenačných knižníc

Pri príprave sekvenačných knižníc bol použitý QIAseq miRNA Library Kit. Týmto setom bolo umožnené presné sekvenovanie novej generácie maturovaných miRNA na prístroji Illumina NGS. Maturované miRNA majú charakteristické skupiny, ktoré umožňujú adaptérom sa špecificky naviazať. Následne prebehla reverzná transkripcia, a tým bola umožnená príprava knižnice maturovaných miRNA s minimálnym pozadím. V prebiehajúcej reakcii sa adaptéry naviazali na 3' a 5' konce miRNA s následnou syntézou cDNA a priradením unikátnych molekulových indexov (UMI, unique molecular indices). Po vyizolovaní sncRNA bola vytvorená sekvenačná knižnica. Rozlišujú sa základné kroky pri príprave knižníc: 3' ligácia, 5' ligácia, cDNA syntéza, cDNA prečistenie, amplifikácia knižnice a prečistenie knižnice.

- **3' ligácia**

Adenylovaný adaptér bol ligovaný na 3' konci jednotlivých miRNA. Pre účinnú ligáciu a prevenciu nežiadúcich vedľajších produktov bola použitá QIAseq miRNA NGS 3' ligáza. Pred začatím bola templátová miRNA rozmrazená na ľade a všetky potrebné reagenty bolo potrebné vytemperovať pri RT.

- **5' ligácia**

Adaptér RNA bol následne naviazaný na 5' koniec maturovanej miRNA. 5' ligačná reakcia bola pripravená na ľade. Po skončení inkubácie bolo možné prejsť na ďalší krok – cDNA syntéza.

- **cDNA syntéza (Reverzná transkripcia)**

UMI je obsiahnutý v priméri reverznej transkripcie. Reverzný primér bol naviazaný na oblasť 3' adaptéra a uľahčila sa tým premena 3' a 5' ligovaných miRNA na cDNA. Počas reverznej transkripcie bola pridávaná univerzálna sekvencia, ktorá bola schopná rozpoznať priméry indexujúce vzorky počas amplifikácie knižnice.

Tabuľka 1 Zloženie reakčnej zmesi pre cDNA syntézu

Zložka	Objem na 1 reakciu
5' ligačná reakcia s RT iniciátorom	42 µl
QIAseq miRNA NGS RT primér – nariedený	2 µl
Nuclease-free voda	2 µl
QIAseq miRNA NGS RT pufor	12 µl
QIAseq miRNA NGS RI	1 µl
QIAseq miRNA NGS RT enzým	1 µl
Celkový objem	60 µl

- **cDNA prečistenie:**

Po reverznej transkripcii bola cDNA prečistená pomocou magnetických guľôčok. Pripravené guľôčky boli použité v kroku pre cDNA syntézu a k reakčnej zmesi k cDNA syntéze bola pridaná zmes s guľôčkami.

- **Amplifikácia knižnice:**

Reakčná zmes na amplifikáciu knižnice bola umiestnená do termocykléra s nastaveným programom, ktorý je uvedený v tab. 2. Po amplifikácii bolo potrebné pridať k reakčnej zmesi guľôčky, zamiešať, scentrifugovať a inkubovať. Skúmavky boli umiestnené na magnetický stojan, kým nedošlo k usadeniu guľôčok. Na stojan boli následne prenesené mikroskúmavky a eluované DNA, ktoré boli prenesené do novej mikroskúmavky predstavovali miRNA sekvenačnú knižnicu. Následne bola stanovená koncentrácia pripravenej knižnice.

Tabuľka 2 Program pre amplifikáciu cDNA knižnice.

1	Počiatočná denaturácia	15 min.	95°C
2	Denaturácia	15 s.	95°C
	Anelácia	30 s.	60°C
	Polymerizácia	15 s.	72°C
3	Záverečná polymerizácia	2 min.	72°C
4	Chladenie	∞	4°C

4.3 Kontrola kvality knižnice

Kvalitu sekvenačnej knižnice môže ovplyvňovať viacero faktorov. Bioanalyzátor na kontrolu kvality a kvantity knižníc sa častokrát používa Agilent TapeStation bioanalyzátor. Postup kontroly kvality sekvenačnej knižnice má následné kroky:

- **Príprava vzorky.**
- **Príprava TapeStation čipu** – po príprave vzorky na bioanalyzátoře bol pripravený čip, ktorý slúži k separácii fragmentov. Na čip bol nanosený elektroforetický gélový materiál, na ktorý boli umiestnené vzorky.
- **Nanášanie vzorky** – vzorka sekvenačnej knižnice sa naniesla na čip a spustila sa elektroforéza. Agilent TapeStation využívala elektroforetické pole k oddeleniu fragmentov podľa príslušnej veľkosti. K rozdeleniu DNA fragmentov bol použitý elektrický prúd.
- **Analýza dát** – po ukončení elektroforézy sa údaje interpretovali a analyzovali.

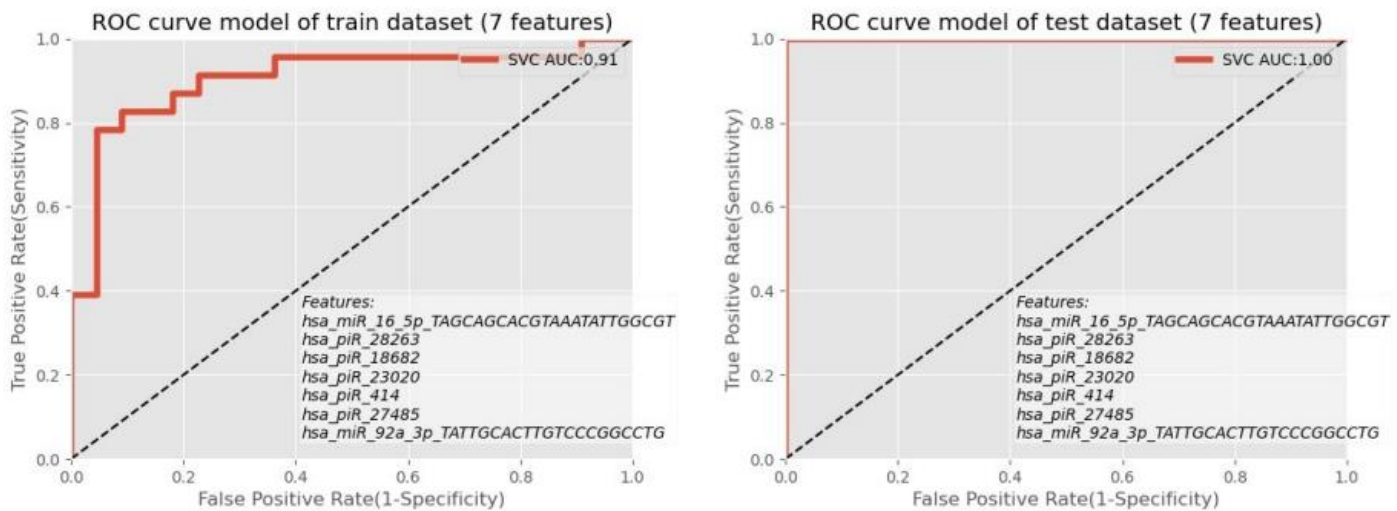
5 Výsledky

Cieľom predpokladanej diplomovej práce bola identifikácia nekódujúcich RNA molekúl dôležitých pri predikcii vývojovej kompetencie ľudských embryí v podmienkach *in vitro* z kultivačného média. Výsledkom NGS analýzy kultivačného média blastocysty boli údaje, ktoré boli interpretované bioinformatickými analýzami. Metódami strojového učenia boli analyzované sekvenčné údaje s cieľom interpretácie všetkých nekódujúcich RNA molekúl komplexne. Z toho dôvodu je možné nájsť vo výslednom súbore analyzovaných molekúl nielen piRNA, ale aj ostatné malé nekódujúce RNA ako sú miRNA. Tieto molekuly sú určené, podľa tab. 3.

Tabuľka 3 Nekódujúce RNA molekuly určené k špecifickej cross validácii qRT-PCR v kultivačnom médiu embrya v IVF procese.

	Kanonické ncRNA	Iso-miRNA
1.	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-16-5p.1
		hsa-miR-16-5p.2
		hsa-miR-16-5p.3
2.	hsa-miR-7-5p	hsa-miR-7-5p.1
		hsa-miR-7-5p.2
		hsa-miR-7-5p.3
3.	hsa-let-7c-5p	hsa-let-7c-5p.1
		hsa-let-7c-5p.2
		hsa-let-7c-5p.3
4.	hsa-let-7f-5p	hsa-let-7f-5p.1
		hsa-let-7f-5p.2
		hsa-let-7f-5p.3
5.	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7a-5p.1
		hsa-let-7a-5p.2
		hsa-let-7a-5p.3
6.	hsa-let-7i-5p	hsa-let-7i-5p.1
		hsa-let-7i-5p.2
		hsa-let-7i-5p.3
7.	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199a-3p.1
		hsa-miR-199a-3p.2
		hsa-miR-199a-3p.3
8.	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-103a-3p.1
		hsa-miR-103a-3p.2
		hsa-miR-103a-3p.3
9.	hsa-piR28061	
10.	hsa-piR28263	
11.	hsa-piR18682	
12.	hsa-piR23020	
13.	hsa-piR414	
14.	hsa-piR27485	

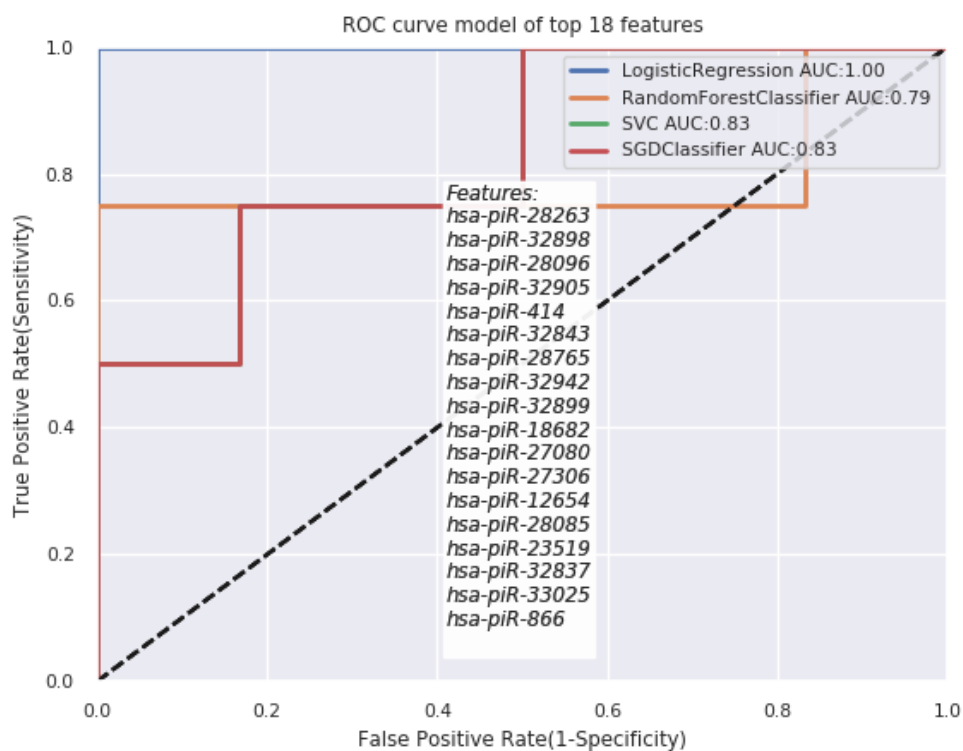
Diplomová práca bola uskutočňovaná v rámci spolupráce s Ústavom lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF v Košiciach. Štandardné kultivačné médium bolo odoberané v piaty deň kultivácie embrya, embryo secernovalo do kultivačnej tekutiny nekódujúce RNA molekuly, ktoré slúžili k diferenciálnej selekcii vysokokvalitného embrya a to nasledovne:



Obrázok 12 ROC analýza s kombináciou molekúl piRNA pre prieskumnú fázu, ako aj pre fázu validácie.

Na obr. 12 je zobrazená ROC analýza nekódujúcich RNA. Na základe výsledkov modelu a vzťahu medzi presnosťou každého modelu a počtom znakov pre oba sledované ukazovatele (AUC, ROC) a skóre F1 oproti niekoľkým prediktívnym biomarkerom miRNA a piRNA došlo k zhode, ktorá potvrdila počet z prediktívnych molekúl na sedem molekúl a ich prediktívna schopnosť odlišiť kvalitu embryí v procese IVF je vyššia ako 86 %.

Po základnom hodnotení prítomnosti počtu readov všetkých nekódujúcich RNA, bola uskutočnená zmena prístupu analýzy počtu readov iba pre skupinu piRNA nekódujúcich molekúl. Bola uskutočnená ROC analýza pre jednotlivé modely umelej inteligencie, kde bolo identifikovaných 18 signifikantných piRNA molekúl s hodnotou AUC krivky pre model logistickej regresie 1,00 (obr. 13). Rovnako bola uskutočnená analýza dôležitosti piRNA, kde faktor dôležitosti uvádzame v tab. 4.



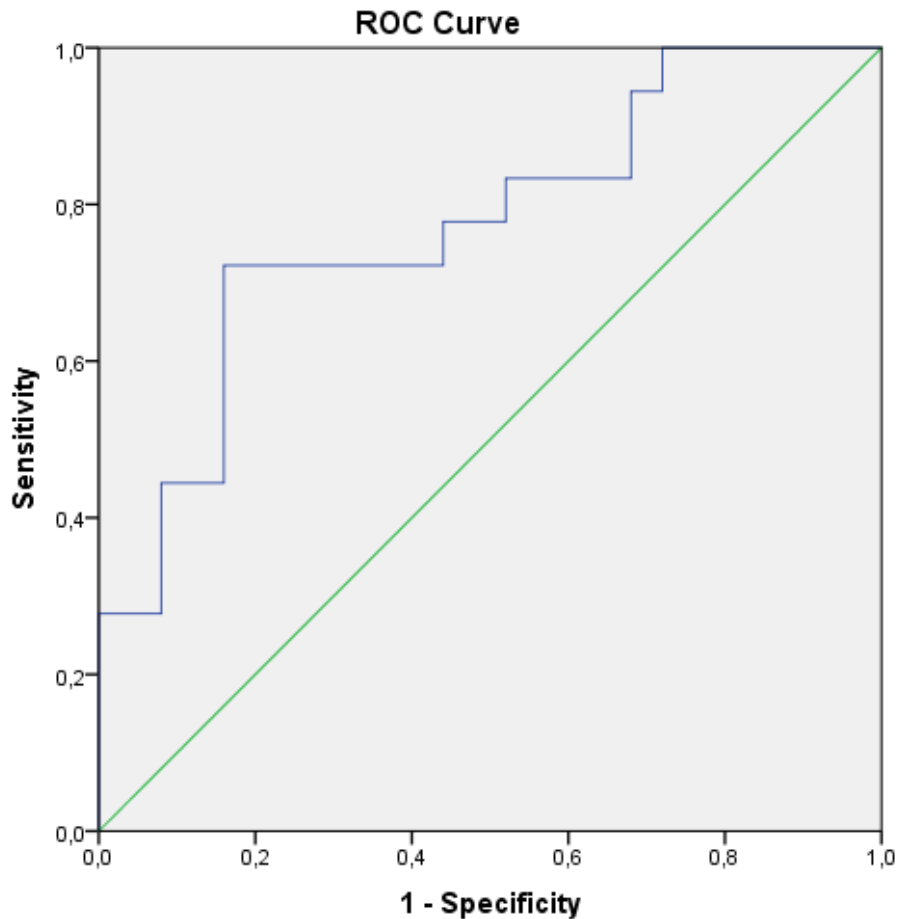
Obrázok 13 ROC analýza príslušných významných piRNA.

Tabuľka 4 Analyzované piRNA s faktorom dôležitosti.

id	piRNA	faktor dôležitosti
1	hsa-piR-28263	0.0636
2	hsa-piR-32899	0.0627
3	hsa-piR-18682	0.0602
4	hsa-piR-32843	0.0502
5	hsa-piR-32898	0.0497
6	hsa-piR-32905	0.0496
7	hsa-piR-28765	0.0474
8	hsa-piR-28085	0.0411
9	hsa-piR-27080	0.0405
10	hsa-piR-28096	0.0402
11	hsa-piR-414	0.0339
12	hsa-piR-866	0.0332
13	hsa-piR-33025	0.0304
14	hsa-piR-12654	0.0276
15	hsa-piR-27306	0.0250
16	hsa-piR-32942	0.0232
17	hsa-piR-23519	0.0231
18	hsa-piR-32837	0.0145

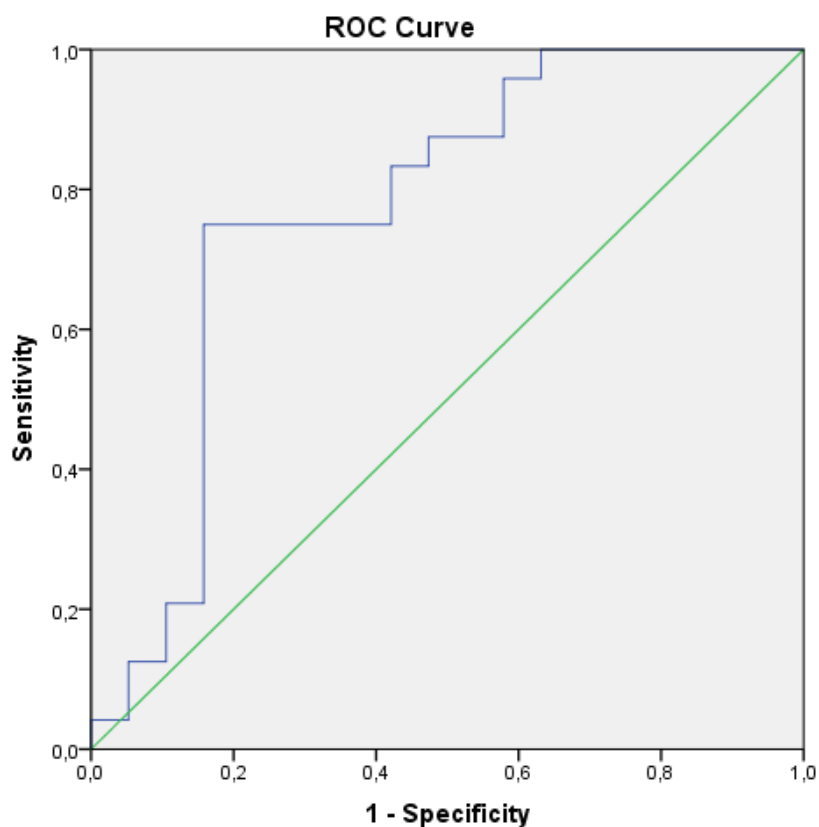
U **hsa-miR-16-5p** bola signifikantne zvýšená expresia v skupine kultivačných médií embryí s nízkou kvalitou a následným neúspešným IVF transferom.

ROC analýza ukázala, že kanonická **hsa-miR-16-5p** by mohla rozlišovať nízko kvalitné, neúspešné embryo v IVF procese so 94% senzitivitou a 72% špecificitou v porovnaní pri selekcii kvalitného embrya.



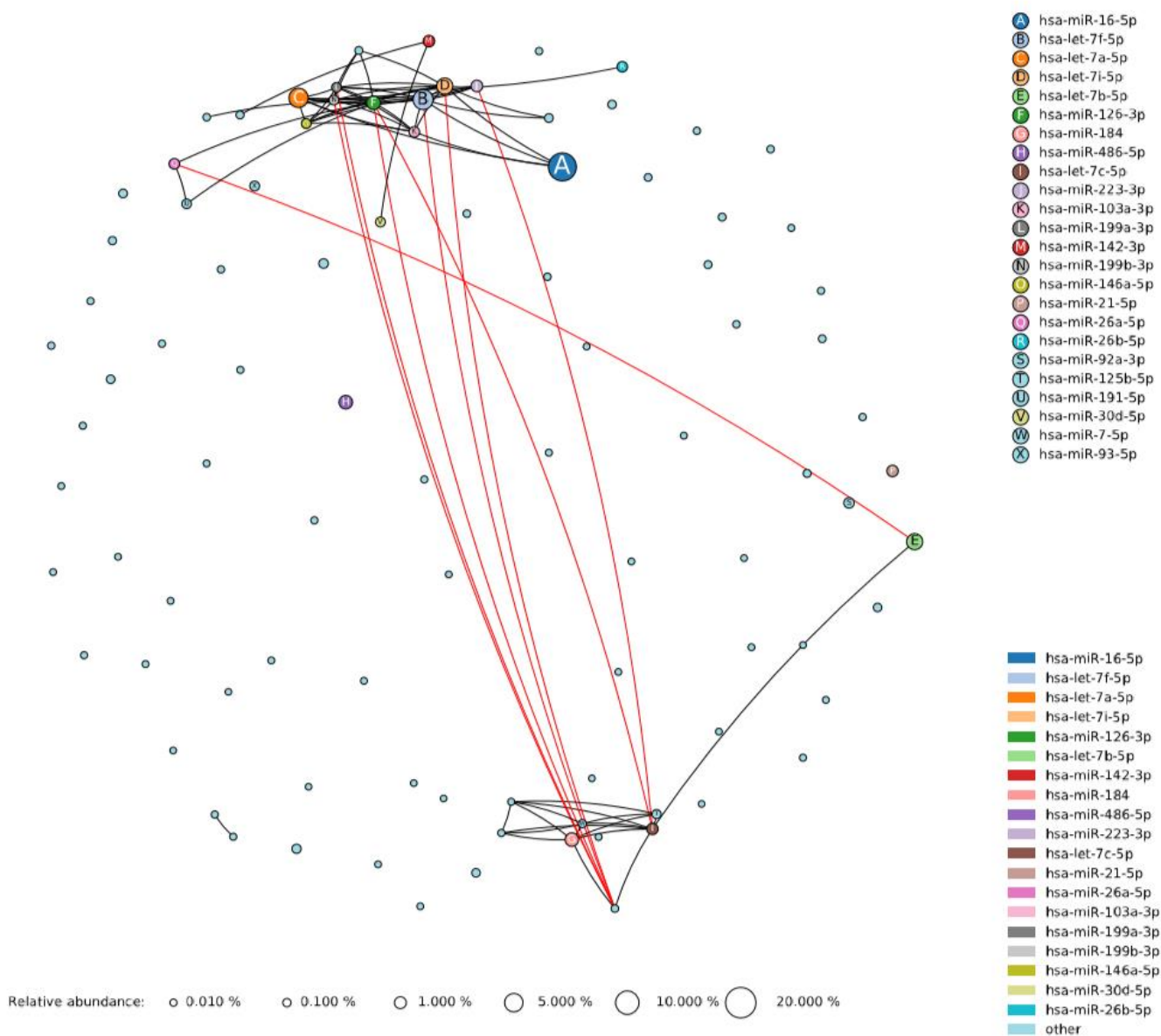
Obrázok 14 ROC analýza kanonickej hsa-miR-16-5p pri selekcii nízko kompetentného, neúspešného embrya.

Prítomnosť **hsa-miR7-5p** v kultivačnom médiu embrya by mohla rozlišovať kvalitné, úspešné embryo v IVF procese pri hraničnej hodnote normalizovaných countov s 96 % senzitivitou a 63% špecificitou v porovnaní kultivačného média nízko kvalitného embrya, neúspešného pri IVF transfere.



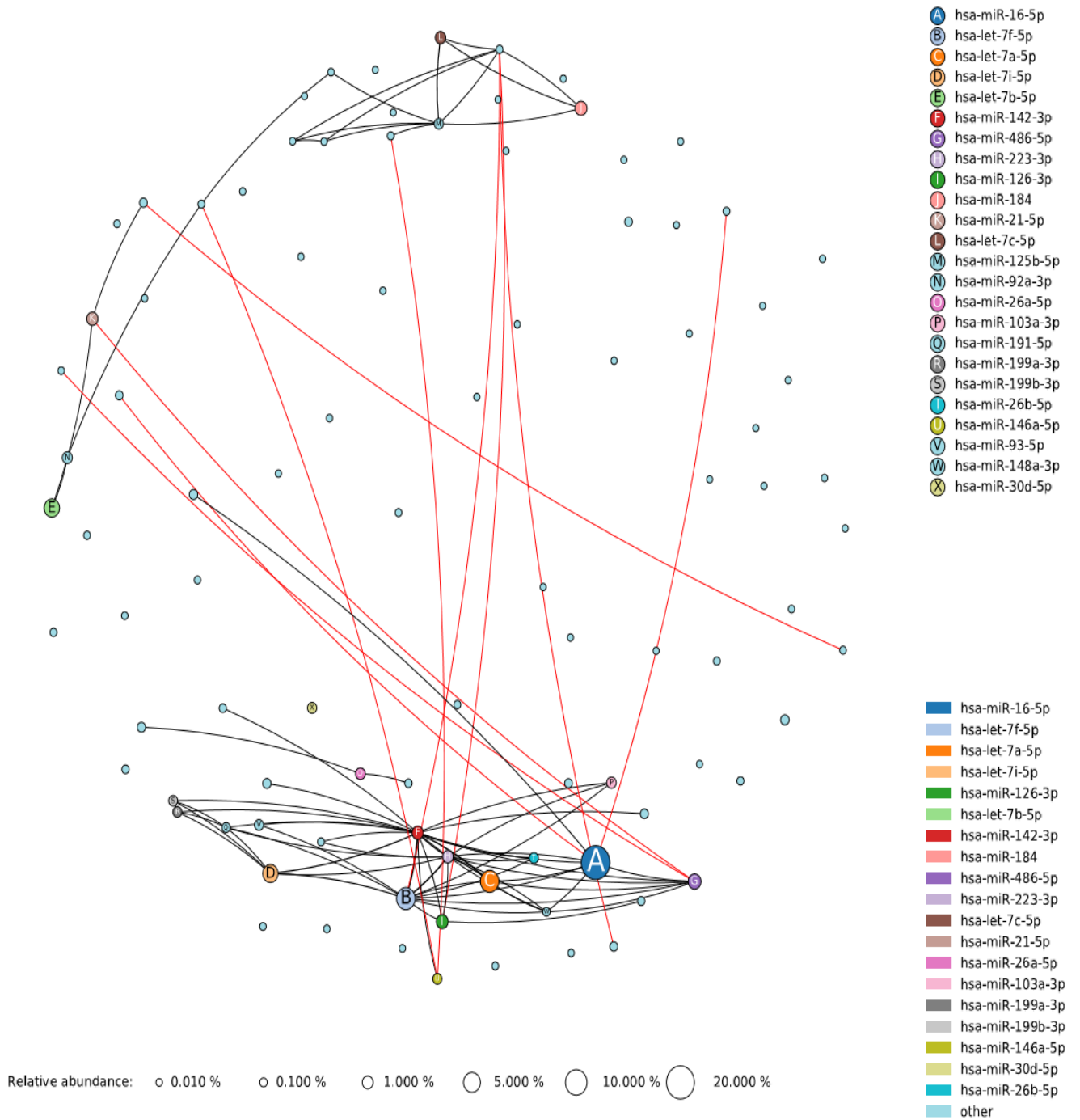
Obrázok 15 ROC analýza kanonickej hsa-miR-7-5p pri selekcii vysoko kompetentného, úspešného embrya.

Pri odlíšení vysoko kompetitívneho, kvalitného embrya v IVF procese je možné ako informáciu zohľadňovať rovnako vzájomné signifikantné pozitívne alebo negatívne korelačné vzťahy kanonických sncRNA molekúl prítomných v kultivačnom médiu embryí, znázornených na obr. 16 a obr. 17 ako aj v tab. 5.



Obrázok 16 Vzájomné korelačné vzťahy kanonických miRNA v kultivačnom médiu embrya IVF úspešného procesu (červená línia – pozitívna korelácia, čierna línia – negatívna korelácia).

cultivation-media_raw-counts-input-for-correlation-analysis_otu_failed_mRNA_sample (basic filter & graph filter)



Obrázok 17 Vzájomné korelačné vzťahy kanonických miRNA v kultivačnom médiu IVF neúspešného procesu (červená línia – pozitívna korelácia, čierna línia – negatívna korelácia).

Tabuľka 5 Korelačné vzťahy kanonických miRNA vo vysoko kompetitívnom a kvalitnom embryu a v nízko kompetentnom embryu.

Korelačný vzťah kanonických miRNA v médiu exfailed – úspešného embrya			Korelačný koeficient <i>r</i>	Korelačná signifikancia <i>p value</i>
1.	hsa-let-7c-5p	hsa-miR-184	0.8154	1,21x10 ⁻⁶
2.	hsa-let-7f-5p	hsa-let-7i-5p	0.8263	6.56x10 ⁻⁶
3.	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-3p	0.8298	5.33x10 ⁻⁶
4.	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-142-3p	0.8518	9.67x10 ⁻⁶
5.	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-16-5p	0.5252	0.01x10 ⁻⁶
6.	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-16-5p	0.6185	0.001x10 ⁻⁶
7.	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-16-5p	0.5464	0.01x10 ⁻⁶
8.	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-16-5p	0.5831	0.002x10 ⁻⁶
Korelačný vzťah kanonických miRNA v médiu failed neúspešného embrya			Korelačný koeficient <i>r</i>	Korelačná signifikancia <i>p value</i>
1.	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-142-3p	0.9128	8.02x10 ⁻⁶
2.	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-223-3p	0.8668	3.73x10 ⁻⁶
3.	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-142-3p	0.8518	9.67x10 ⁻⁶
4.	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-3p	0.8080	9.43x10 ⁻⁶
5.	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-223-3p	0.7955	1.63x10 ⁻⁶
6.	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-142-3p	0.7806	2.98x10 ⁻⁶
7.	hsa-let-7c-5p	hsa-miR-125b-5p	0.7661	5.15x10 ⁻⁶
8.	hsa-let-7c-5p	hsa-miR-184	0.7295	1.75x10 ⁻⁶
9.	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-205-5p	0.7042	3.67x10 ⁻⁶
10.	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-16-5p	0.7012	3.94x10 ⁻⁶

6 Diskusia

Výber najkvalitnejšieho embrya na single embryo transfer je jedným z najdôležitejších faktorov, ktoré výrazne ovplyvňujú úspešnosť IVF procesu. V súčasnej dobe sa kvalita embryí hodnotí na základe morfokinetických znakov, ktoré však nepredikujú ploidity a úspešnosť implantácie embrya. Biomarkerom ploidity je v praxi preimplantačné genetické testovanie, ktoré však predstavuje invazívny odber biologického materiálu, a predstavuje vysoké finančné náklady pre pacientov.

V súčasnosti sa čoraz viac kladie dôraz na malé nekódujúce RNA, pričom existuje niekoľko štúdií zaoberajúcich sa ich dôležitou úlohou v reprodukčnom systéme. Malé nekódujúce RNA – piRNA a miRNA sú secernované do extracelulárneho prostredia, a ukazujú sa ako vhodný prognosticko-prediktívny biomarker priamo v praxi pri výbere kompetentného embrya.

Existuje niekoľko štúdií zaoberajúcich sa piRNA molekulami určenými BioMAI prediktorom, ktoré predpovedali súvislosť medzi piRNA a plodnosťou. Piwi-interagujúce RNA spolu s piwi proteínmi majú dôležitú funkciu pri vývoji zárodočných buniek a sú priamo spojené s plodnosťou u oboch pohlaví. U mužského pohlavia vedie dysregulácia piRNA k zastaveniu vývoja v štádiu okrúhlych spermíí bez prítomnosti predĺžených alebo zrelých spermíí v tkanive semenníkov. V prípade ženského pohlavia, ženy s defektnou biogenezou piRNA vrátane rodiny piwi proteínov, vykazujú normálnu oogenézu aj plodnosť (Kamalideghan a kol. 2020).

Úloha piRNA v stabilite materskej mRNA v oocytoch a embryách, ktorá bola študovaná na modeli škrečka (Zhang a kol. 2021) poukázala na dráhy piRNA v regulácii ženskej fertility. Ďalšia štúdia poukázala na funkciu piRNA v oocytoch aj embryách (Ding a kol. 2022).

Toporcerová a kol. (2022) sa podieľali na vývoji nástroja na predikciu skóre embryí k selekcii kompetitívnych embryí pomocou EmbryoScope a sncRNA z modelu BioMAI. Tento model je prediktívnym modelom, ktorý umožňuje prognózu kompetencie embrya na prenos do matrice. Pomocou tohto nástroja by mohlo byť možné pomôcť embryológom urobiť rozhodnutie pri rozlíšení kompetitívneho embrya od nekompetitívneho, čo by pomohlo pacientkám donosiť potomstvo a znížiť tak opakované transfery. Mohli by sa tým znížiť aj ekonomické náklady na liečbu neplodnosti a zvýšila by sa úspešnosť implantácie embryí.

BioMAI identifikoval dve miRNA, konkrétne **miR-92a** a **miR-16-5p** a päť piRNA, konkrétne **piR-28263**, **-18682**, **-23020**, **-414** a **-27485** ako potenciálne biomarkery pre identifikáciu embryí, ktoré sú vhodné na implantáciu z 11 sncRNA s vysokým skóre na základe troch modelov (XGBoost, Lasso, Extra Random trees) z 11 338 molekúl, ktoré boli identifikované v génovom sekvenovaní. Táto štúdia použila umelú inteligenciu na identifikáciu dvoch špecifických miRNA a piatich piRNA zo sekvenáčnych údajov SBM, ktoré prediktívne vyberú kvalitné embryo vhodné na prenos do maternice medzi ostatnými embryami s nízkou kvalitou s presnosťou 86 % (Toporcerová a kol. 2022).

Timofeeva a kol. (2020) sa snažili vo svojej štúdii poukázať na zvýšenú expresiu sncRNA do kultivačného média, ktoré majú vplyv na reguláciu ranej embryogenézy, a to: **hsa_piR_011291**, **hsa_piR_019122**, **hsa_piR_001311**, **hsa_piR_015026**, **hsa_piR_015462**, **hsa_piR_016735**, **hsa_piR_019675**, **hsa_piR_020381**, **hsa_piR_004880**, **hsa-let-7b-5p** a **hsa-let-7i-5p**.

Tieto malé nekódujúce RNA sú schopné regulovať veľké množstvo génov. Identifikované cieľové gény kódujú **transkripčné regulátory** - faktor zosilňujúci transkripciu TEF-1 (**TEAD1**, TEA domain transcription factor 1), faktor zosilňujúci transkripciu TEF-5, (**TEAD3**, TEA domain transcription factor 3), transkripčný faktor PU.1 (**SPI1**, SPI1 Proto-Oncogene), transkripčný faktor SP3 (**SP3**, Transcription factor 3) ďalej **enzýmy** ako glykozytransferáza, kináza, deacetyláza, hydroláza, fosfolipáza, ligáza a oxidoreduktáza; **proteíny, ktoré viažu RNA** - homológ D Mex-3 (**MEX3D**, Mex-3 RNA Binding Family Member D), proteín viažuci proteín 2 aktivujúci Ras GTPázu (**G3BP2**, Ras GTPase-activating protein-binding protein 2), proteín 2 viažuci mRNA rastový faktor podobný inzulínu (**IGF2BP2**, Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2) a proteín viažuci RNA s viacnásobným zostrihom (**RBPMS**, RNA Binding Protein, mRNA Processing Factor); **enzýmy, ktoré modifikujú proteíny** - nervová prekurzorová bunka exprimovaná vývojovo downregulovaným génom podobným 4 (**NEDD4L**, Neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like), proproteín konvertáza subtilizín/ kexín typu 6 (**PCSK6**, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6) a karnozín dipeptidáza 2, (**CNDP2**, carnosine dipeptidase 2); **modulátory aktivity viazania proteínov** - neuroblastóm RAS vírusový onkogénový homológ (**NRAS**, Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog), regulátor signalizácie G-proteínu 16 (**RGS16**, Regulator of G-protein signaling 16), alfa podjednotka proteínu G viažúceho guanínový nukleotid (**GNAL**, G Protein Subunit Alpha L); **signálne transmembránové receptory** - (**FZD5**, Frizzled Class Receptor 5), receptor B kyseliny gama-

aminomaslovej, 2 (**GABBR2**, Gamma-aminobutyric acid B receptor, 2); **adaptorové proteíny** - GRB2-asociovaný väzbový proteín 2 (**GAB2**, GRB2-associated-binding protein 2), proteín viažúci kinázu 1 (**AKAP1**, A kinase anchor protein 1), ELMO doména obsahujúca 2 (**ELMOD2**, ELMO Domain Containing 2); **transportéry** - ATPáza 1 prenášajúca vápnik z plazmatickej membrány (**ATP2B1**, Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1) a fosfolipidová scrambláza 3 (**PLSCR3**, Phospholipid scramblase 3) a **membránové transportné proteíny** – doplnkový proteín receptora 3 (**REEP3**, Receptor Accessory Protein 3) a synapsín II (**SYN2**, Synapsin II). Cieľové gény sledovaných sncRNA sú podľa štúdie zodpovedné za regulačné procesy pri dozrievaní gamét a v preimplantačnom vývoji embryí.

V štúdií bolo dokázané, že embryá, ktoré dosiahli štádium blastocysty s dobrou morfológiou, vylučovali do SBM **hsa_piR_011291, hsa_piR_001311, hsa_piR_015462, hsa_piR_016735, hsa_piR_019675, hsa_piR_020381, hsa_piR_004880**.

Embryá, ktoré dosiahli štádium moruly, ale následne sa prestali vyvíjať, vylučovali do SBM: **hsa_piR_001311, hsa_piR_015462, hsa_piR_019675, hsa_piR_020381, a hsa_piR_004880** (Timofeeva a kol. 2020).

Cimadomo a kol. (2019) sa vo svojej štúdií snažili identifikovať miRNA v SBM ako možné biomarkery implantácie. Podarilo sa im identifikovať 8 miRNA **implantovaných blastocýst** (miR-19b-3p, miR-193b-3p, miR-517a-3p, miR-99a-5p, miR-525-3p, miR-503-5p, miR-518f-5p, miR-548c-5p) a 8 miRNA v SBM **neimplantovaných blastocýst** (miR-940, miR-1972, miR-519d-3p, miR-125b-5p, miR-25-3p, miR-367-3p, miR-515-3p, miR-423-5p) (Cimadomo a kol. 2019).

V tejto práci sme preukázali prítomnosť piRNA molekúl **hsa_piR_28263, hsa_piR_18682, hsa_piR_23020, hsa_piR_414, hsa_piR_27485** vylučovaných do SBM v súvislosti s úspešným embryotransferom. Súčasne bola podľa umelej inteligencie vyhodnotená významná prítomnosť **hsa-miR-7-5p** spojená s vysokou kvalitou embrya a úspešným embryotransferom. Tieto zistenia by mohli prispieť pri výbere potenciálne kompetentného embrya na embryotransfer priamo v klinickej praxi.

Vhodným výberom molekulovej metódy s cieľom analyzovať malé nekódujúce RNA vylučované embryami do kultivačného média by do budúcnosti mohli predstavovať neinvazívny spôsob odberu biologického materiálu k výberu kompetentného embrya. Týmto spôsobom by mohlo dôjsť ku skvalitneniu a urýchleniu celkového procesu liečby neplodnosti, a tým aj zvýšeniu počtu úspešných tehotenstiev.

7 Záver

- Na základe literárnej rešerše bol urobený prehľad malých nekódujúcich RNA exprimovaných do kultivačného média. Ľudské embryá secernujú vo väčšej miere špecifické piRNA a miRNA molekuly do SBM.
Toto tvrdenie podložené teoretickou časťou bolo potvrdené aj experimentálnou analýzou, ktorá poukázala na ich prítomnosť v SBM a ich možný prediktívny charakter pri výbere kompetentného embrya.
- Na základe literárnej rešerše boli popísané jednotlivé molekulové metódy k analýze expresie nekódujúcich RNA molekúl v kultivačnom médiu embrya. Ako vhodné molekulové metódy sú NGS sekvenovanie a kvantitatívna Real-Time PCR. Obe ponúkajú vysoko citlivú a spoľahlivú detekciu snRNA, avšak NGS molekulová sekvenácia nevyžaduje predchádzajúce znalosti o sekvenačných informáciách, čím bola táto metóda preferovaná k analýze nekódujúcich RNA molekúl. Použili sa aj štatistické metódy, a to korelačné analýzy TINA, SPARCC a analýzy senzitivity a špecificity testov pomocou ROC kriviek (Receiver operating characteristic curve).
V budúcnosti je možné popremýšľať aj na re-update metód pomocou jedinečnej kombinácie molekulových technológií (NGS sekvenovania a kvantitatívnej Real-Time PCR), ktoré sa vzájomne krížovo validujú, a tým zvyšujú špecifičnosť diagnostického testu ako sa aj predchádza v tzv. miss diagnostike.
- V experimentálnej časti práce bola preukázaná signifikantná prítomnosť piRNA a miRNA v SBM, ktoré súvisia s implantačnou schopnosťou embrya. Na základe tejto práce sa nám podarilo preukázať zvýšená expresia piRNA a to: **hsa_piR_28263**, **hsa_piR_18682**, **hsa_piR_23020**, **hsa_piR_414**, **hsa_piR_27485** v kultivačnom médiu embryí, ktoré boli spojené s úspešnými embryotransfermi. V prípade miRNA bola preukázaná signifikantne zvýšená expresia **hsa-miR-16-5p** v skupine kultivačných médií embryí s nízkou kvalitou a následným neúspešným IVF transferom, v porovnaní s **hsa-miR-7-5p**, ktorá vykazovala zvýšenú expresiu v kultivačnom embryu s vysokou kvalitou spojenou s úspešným embryotransferom.

8 Zoznam skratiek

AKAP1	proteín viažúci kinázu 1
ATP2B1	ATPáza 1 prenášajúca vápnik z plazmatickej membrány
AUC	area under the ROC curve
cDNA	komplementárna deoxyribonukleová kyselina
COC	komulo-oocytárne komplexy
CO ₂	oxid uhličitý
CNDP2	karnozín dipeptidáza 2
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfáty
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfáty
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ELMOD2	ELMO doména obsahujúca 2
E2	prostaglandín
FZD5	frizzled receptor 5
GAB2	GRB2-asociovaný väzbový proteín 2
GABBR2	receptor B kyseliny gama-aminomaslovej, 2
GNAL	alfa podjednotka proteínu G viažúceho guanínový nukleotid
G3BP2	proteín viažúci proteín 2 aktivujúci Ras GTPázu
HA	hypotalamická amenorea
hCG	humánný chóriový gonadotropín
NaHCO ₃	hydrogénuhličitan sodný
HSA	ľudský sérový albumín
ICM	vnútorná bunková hmota

ICSI	intracytoplazmatická injekcia spermie
IGF2BP2	proteín 2 viažúci mRNA rastový faktor podobný inzulínu
IVF	<i>in vitro</i> fertilizácia
lncRNA	dlhé nekódujúce ribonukleové kyseliny; long non-coding RNA
NEDD4L	nervová prekursorová bunka exprimovaná vývojovo downregulovaným génom podobným 4
microarray	mikročipová analýza
MEX3D	homológ D Mex-3
miRNA	mikro-ribonukleová kyselina
MM	mastermix
mRNA	molekulová ribonukleová kyselina
ncRNA	malé nekódujúce ribonukleové kyseliny
NEAA	neesenciálne aminokyseliny
NGS	sekvenovanie novej generácie
NK	nukleové kyseliny
NRAS	neuroblastóm RAS vírusový onkogénový homológ
O ₂	kyslík
PCOS	syndróm polycystických vaječníkov
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PCSK6	proteín konvertáza subtilizín/ kexín typu 6
PGT	preimplantačné genetické testovanie
PGT-A	preimplantačné genetické testovanie aneuploidií
PGT-M	preimplantačné genetické testovanie monogénnych ochorení
PGT-SR	preimplantačné genetické testovanie – štruktúrne chromozómové prestavby

piRNA	piwi-interagujúca ribonukleová kyselina
PLSCR3	fosfolipidová scrambláza 3
POI	predčasná ovariálna insuficiencia
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrolidón
q-PCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
qRT-PCR	polymerázová reťazová reakcia pomocou reverznej transkriptázy
RBPM5	proteín viažuci RNA s viacnásobným zostrihom
RCF	relatívna odstredivá sila
REEP3	doplnkový proteín receptora 3
RGS16	regulátor signalizácie G-proteínu 16
RNA	ribonukleová kyselina
ROC	receiver operating characteristic curve
RT	izbová teplota
SBM	zvyškové blastocystové médium; spend blastocyst medium
sncRNA	malé nekódujúce ribonukleové kyseliny
SPI1	transkripčný faktor PU.1
SP3	transkripčný faktor 3
SYN2	synapsín 2
TE	trofektoderm
TEAD1	faktor zosilňujúci transkripciu TEF-1
TEAD3	faktor zosilňujúci transkripciu TEF-5
Treg	T – regulačné bunky
UI	nevysvetliteľná neplodnosť; unexplained infertility

UMI unique molecular indices

ZP *Zona Pellucida*

9 Zoznam ilustrácií

Obrázok 1 Bezpečné farby svetla pre použitie v TimeLapse.....	27
Obrázok 2 Anotačný systém KidScore z EmbryoScope+	29
Obrázok 3 Rozdiely v pH v ženskom reprodukčnom systéme	34
Obrázok 4 Porovnanie morfokinetických znakov euploidného a aneuploidného embrya	37
Obrázok 5 Priebeh biopsie	40
Obrázok 6 Vybrané miRNA z kultivačného média blastocýst a ich cieľové gény.	44
Obrázok 7 Teoretická amplifikácia cieľového fragmentu DNA pri zvyšujúcom sa počte cyklov	46
Obrázok 8 Spätná polymerázová reakcia s využitím oligo(dT)-primeru	48
Obrázok 9 Sangerova metóda sekvenovania DNA	50
Obrázok 10 Porovnanie I. a II. generácie sekvenovania	52
Obrázok 11 Princíp pyrosekvenovania	53
Obrázok 12 ROC analýza s kombináciou molekúl piRNA pre prieskumnú fázu, ako aj pre fázu validácie	60
Obrázok 13 ROC analýza príslušných signifikantných piRNA	61
Obrázok 14 ROC analýza kanonickej hsa-miR-16-5p pri selekcii nízko kompetentného, neúspešného embrya.....	62
Obrázok 15 ROC analýza kanonickej hsa-miR-7-5p pri selekcii vysoko kompetentného, úspešného embrya.	63
Obrázok 16 Vzájomné korelačné vzťahy kanonických miRNA v kultivačnom médiu embrya IVF úspešného procesu.....	64
Obrázok 17 Vzájomné korelačné vzťahy kanonických miRNA v kultivačnom médiu IVF neúspešného procesu	65

10 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Zloženie reakčnej zmesi pre cDNA syntézu.....	57
Tabuľka 2 Program pre amplifikáciu cDNA knižnice	57
Tabuľka 3 Nekódujúce RNA molekuly určené k špecifickej cross validácii qRT-PCR v kultivačnom médiu embrya v IVF procese.	59
Tabuľka 4 Analyzované piRNA s faktorom dôležitosti.....	61
Tabuľka 5 Korelačné vzťahy kanonických miRNA vo vysoko kompetitívnom a kvalitnom embryu a v nízko kompetentnom embryu	66

11 Použitá literatúra

1. Abeyta M., Behr B. (2014) Morphological assessment of embryo viability. *Semin. Reprod. Med.* 32, 114–126.
2. Aplin J.D. (2000) The cell biological basis of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 14, 757 – 764.
3. Asami M., Lam B.Y.H., Ma M.K., Rainbow K, Braun S., VerMilyea M.D., Yeo G.S.H., Perry A.C.F. (2022) Human embryonic genome activation initiates at the one-cell stage. *Cell Stem Cell.* 29(2), 209-216.
4. Baibakov B., Boggs N.A., Yauger B., Baibakov G., Dean J. (2012) Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *The Journal of Cell Biology.* 197(7), 897–905.
5. 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(2), 282–287.
6. Bartels Ch.B., Makhijani R., Godiwala P., Bartolucci A., Nulsen J.C., Grow D.R., Engmann L. and Benadiva C.A. In vitro fertilization outcomes after preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangements comparing fluorescence in-situ hybridization, microarray comparative genomic hybridization, and next-generation sequencing. *F&S Reports.* 1(3), 249 – 256.
7. Bartošík M., Jiráková L. (2018) Current Methods of microRNA Analysis. *Klinická Onkologie: Časopis České a Slovenské Onkologické Společnosti.* 31(2), 93-101.
8. Behjati S., Tarpey P.S. (2013) What is next generation sequencing?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 98(6), 236-238.
9. Biggers J.D. Fundamentals of the Design of Culture Media that Support Human Preimplantation Development. Essential IVF, 2004, 291-332s. ISBN 978-1-4613-4735-4.
10. Bonus M.L., McQueen D.B., Ruderman R., Hughes L., Merrion K., Maisenbacher M.K., Feinberg E., Boots Ch. (2022) Relationship between paternal factors and embryonic aneuploidy of paternal origin. *Fertility and Sterility.* 118(2), 281 – 288.
11. Bouniol-Baly C., et al. (1999) Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod.* 60(3), 580–587.

12. Braekeleer M.D., Dao T.N. (1990) Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Human Reproduction*. 5(5), 519–528.
13. Brazdova A., Senechal H., Peltre G., Poncet P. (2016a) Immune Aspects of Female Infertility. *International journal of fertility & sterility*. 10(1), 1–10.
14. Brazdova A., Senechal H., Peltre G., Poncet P. (2016b) Immune Aspects of Female Infertility. *International journal of fertility & sterility*. 10(1), 25-26.
15. Burns K.H., Matzuk M.M (2006) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd edition. 2006, 3296 strán. ISBN 978-0-12-515400-0.
16. Cairo Consensus Group. (2020) ‘There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything’ Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reproductive BioMedicine Online*. 40(1), 33-60.
17. Cimadomo D., Rienzi L., Gianciani A., Alviggi E., Dusi L., Canipari R., Noli L., Ilic D., Khalaf Y., Ubaldi F.M., Capalbo A. (2019) Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: searching for biomarkers of implantation. *Hum Reprod*. 34(9), 1746-1761.
18. Cliff D. and Schuh M. (2013) Re-starting life: Fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14(9): 549–562.
19. Coulam C.B., Jeyendran R.S., Fishel L.A., Roussev R. (2006) Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reproductive BioMedicine Online*. 12(3), 322-327.
20. Coulam C.B., Jeyendran R.S. (2009) Trombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility. *Supplement*. 1516-1517.
21. Dahdouh E.M., Balayla J., García-Velasco J.A. (2015a) Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. *Reprod Biomed Online*. 30(3), 281-289.
22. Dahdouh E.M., Balayla J., Audibert F., Wilson R.D., Brock J.A., Campagnolo C., Carroll J., Chong K., Gagnon A., Johnson J.A., MacDonald W., Okun N., Pastuck M., Vallée-Pouliot K. (2015b) RETIRED: Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 37(5), 451-463.
23. Ding D., Chen C. (2022) Cracking the Egg: A Breakthrough in PiRNA Function in Mammalian Oocytes and Embryos. *Biology of Reproduction*. 106 (1), 6–8.

24. Emery B.R., Carrell D.T. (2006) The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl.* 8(2), 131-142.
25. Ezoe K., Miki T., Okimura T. et al. (2021) Characteristics of the cytoplasmic halo during fertilisation correlate with the live birth rate after fresh cleaved embryo transfer on day 2 in minimal ovarian stimulation cycles: a retrospective observational study. *Reprod Biol Endocrinol.* 19(1), 172.
26. Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. (2007) Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online.* 14(6), 734-745.
27. Fisch J.D., Sher G., Adamowicz M., Keskindepe L. (2003) The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril.* 80(6), 1352-1358.
28. Fu J., Wang X.J., Wang Y.W., Sun J., Gemzell-Danielsson K., Sun X.X. (2009) The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 26(8), 437-441.
29. Gardner D.K., Lane M. (1993) Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod.* 48(2), 377-385.
30. Gauster M., Moser G., Wernitznig S. et al. (2022) Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cell. Mol. Life Sci.* 79(6), 345.
31. Geryková Bujalková M., Lohajová Behulová R., Lukačková R., Minárik G., Szemes T. (2015) Sekvenovanie novej generácie a jeho využitie v klinickej genetike. *NewsLab.* 1, 15.
32. Govindarajan R., Duraiyan J., Kaliyappan, K., and Palanisamy M. (2012) Microarray and its applications. *Journal of pharmacy & bioallied sciences.* 4, 310-312.
33. Greco E., Litwicka K., Minasi M.G., Cursio E., Greco P.F. and Barillari P. (2020) "Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today". *International Journal of Molecular Sciences.* 21(12), 4381.
34. Gruber I., Klein M. (2011) Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist?. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 12(2), 110-117.
35. Hardarson T., Van Landuyt L. and Jones G. (2012) The blastocyst. *Human Reproduction.* 27(1), 72-91.
36. Harper M.J. (1992) The implantation window. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 6(2), 351-371.

37. He H., Jing S., Lu Ch.F., Tan Y.Q., Luo K.L., Zhang S.P., Gong F., Lu G.X., Lin G. (2019) Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. *Fertility and Sterility*. 112(1), 82 – 88.
38. Hentemann M., Mousavi K., Bertheussen K. (2011) Differential pH in embryo culture. *Fertility and Sterility*. 95(4), 1291.
39. Hernández-Vargas P., Muñoz M., Domínguez F. (2020) Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Hum Reprod Update*. 26(2), 264-301.
40. Hobson N., Schmidt U. and McArthur S. Development of Human Blastocyst. Human Stem Cell Manual. A Laboratory Guide. 2nd edition, 2012, 545-551. ISBN 978-0-12-385473-5.
41. Iwasaki Y.W., M.C. Siomi, Siomi H. (2015) PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry*. 84(1), 405-433.
42. Jacobs M., Stolwijk A.M., Wetzels A.M.M. (2001) The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI. *Human Reproduction*. 16(8), 1708–1713.
43. Kakourou G., Jaroudi S., Tulay P., Heath C., Serhal P., Harper J.C., SenGupta S.B. (2013) Investigation of gene expression profiles before and after embryonic genome activation and assessment of functional pathways at the human metaphase II oocyte and blastocyst stage. *Fertility and Sterility*. 99(3), 803-814.
44. Kamalidehghan B., Habibi M., Afjeh S. S., Shoai M., Alidoost S., Almasi Ghale R., Eshghifar N., Pouresmaeili F. (2020) The Importance of Small Non-Coding RNAs in Human Reproduction: A Review Article. *Appl Clin Genet*. 13, 1–11.
45. Kaye L., Marsidi A., Rai P. et al. (2018) Frozen blastocyst transfer outcomes in immediate versus delayed subsequent cycles following GnRH agonist or hCG triggers. *J Assist Reprod Genet*. 35(4), 669–675.
46. Kim S.M. and Kim J.S. (2017) A Review of Mechanisms of Implantation. *Dev. Reprod*. 21(4), 351- 359.
47. Kovacs P. (2014) Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12, 124.
48. Križanová O. (2012) Vybrané biochemické a molekulárne-biologické metódy v lekárskom výskume a medicínskej diagnostike, Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Bratislava, str. 10-38.

49. Kubisz P., Bartošová L., Dobrotová M., PhD., Staško M. (2010) Trombofilné stavy a gravidita. *Vask. med.* 2(1), 21–23.
50. Lane M., Gardner D.K. (2007) Embryo culture medium: which is the best?. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 21(1), 83-100.
51. Larsen W.J., Sherman L.S., Potter S.S. and Scott W.J. Human embryology (3rd ed.). Elsevier Health Sciences. 2001, 548 strán. ISBN 978-0-443-06583-5.
52. Lee I., Gupta S.A., Gallop R., Dokras A. (2020) Utilization of preimplantation genetic testing for monogenic disorders. *Fertility and Sterility*. 114(4), 854 – 860.
53. Leese H.J., Barton A.M. (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos volume. *J. Reprod. Fert.* 72(1), 9-13.
54. Li R., Du F., Ou S., Ouyang N. and Wang W. (2022) A new method to rescue embryos contaminated by bacteria. *F&S Reports*. 3(2), 168–171.
55. Lo Y.M.D. Clinical Applications of PCR. Humana Press Inc. 1998, 352 strán. ISBN 978-0-89603-499-0.
56. Lundin K., Ahlström A. (2021) Manual of Embryo Culture in Human Assisted Reproduction. *Cambridge University Press*. s. 13.
57. McGowen M.R., Erez O., Romero R., Wildman D.E. (2014) The evolution of embryo implantation. *Int J Dev Biol*. 58(2-4), 155-161.
58. Morbeck D.E., Baumann N.A., Oglesbee D. (2017) Composition of single-step media used for human embryo culture. *Fertility and Sterility*. 107(4), 1055-1060.
59. Morin S.J., Eccles J., Iturriaga A., Zimmerman R.S. (2017) Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. *Fertility and Sterility*. 107(1), 19 – 26.
60. Ng K. Y. B., Mingels R., Morgan H., Macklon N., Cheong, Y. (2017) In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 24(1), 15–34.
61. Nikolaou D., Templeton A. (2003) Early ovarian aging: A hypothesis. Detection and clinical relevance. *Human Reproduction*. 18(6), 1137-1139.
62. O’Flynn K.L., O’Brien B.A., Varghese A.C. and Agarwal A. (2010) The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertility and Sterility*. 93(1), 2-3.
63. Ohlander S.J., Lindgren M.C., Lipshultz L.I. (2016) Testosterone and Male Infertility. *Urol Clin North Am*. 195-202.

64. Papler T.B., Abdulkhalikova D., Jančar N., Šuštaršič A., Vrtačnik Bokal E. (2022) Spontaneous pregnancy rates after the weight loss program in infertile PCOS women with obesity. *Human Reproduction*. s. 576.
65. Pastoráková A. a Petrovič R. Molekulárne metódy aktuálne používané v klinickej genetike. 1. vydanie, Univerzita Komenského v Bratislave, 2016, 50 strán. ISBN 978-80-223-4231-5.
66. Perkel K.J., Madan P. (2017) Spent culture medium analysis from individually cultured bovine embryos demonstrates metabolomic differences. *Zygote*. 25(6), 662-674.
67. Peterson S.E., Loring J.F. (2012) Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide. *Academic Press*. s. 545.
68. Quinn P., Cooke S. (2004) Equivalency of culture media for human in vitro fertilization formulated to have the same pH under an atmosphere containing 5% or 6% carbon dioxide. *Fertil Steril*. 81(6), 1502-1506.
69. Quinn P. Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART. Cambridge University Press. 2014, 296 p. ISBN 978-1-107-61953-1.
70. Ramathal C., Reijo Pera, R.A., and Chavez S.L. (2015) Preimplantation Embryo Development and Primordial Germ Cell Lineage Specification. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 1, 233–265.
71. Rehman K.S., Bukulmez O., Langley M., Carr B.R., Nackley A.C., Doody K.M., Doody K.J. (2007) Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertility and Sterility*. 87(5), 1041-1052.
72. Richter K.S. (2008) The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 20(3), 292-304.
73. Rosenbluth E.M., Shelton D.N., Sparks A.E.T., Devor E., Christenson L., Van Voorhis B.J. (2013) MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertility and Sterility*. 99(3), 855-861.
74. Rosenbluth E.M., Shelton D.N., Wells L.M., Sparks A.E., Van Voorhis B.J. (2014) Human embryos secrete microRNAs into culture media-a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril*. 101(5), 1493-500.
75. Rubino P., Tapia L., Ruiz de Assin Alonso R., Mazmanian K., Guan L., Dearden L., Thiel A., Moon C., Kolb B., Norian J.M., Nelson J., Wilcox J., M.D. and Tan T. (2020)

- Trophectoderm biopsy protocols can affect clinical outcomes: time to focus on the blastocyst biopsy technique. *Fertility and Sterility*. 113 (5), 15-282.
76. Rumbold A.R., Sevoyan A., Oswald T.K., Fernandez R.C., Davies M.J., and Moore V.M. (2019) Impact of male factor infertility on offspring health and development. *Fertil Steril*. 111(6), 1047-1053.
 77. Rutstein S.O. and Shah I.H. (2004) Infecundity infertility and childlessness in developing countries. Geneva: World Health Organization.
 78. Sari I., Gumus E., Taskiran A.S., Karakoc Sokmensuer L. (2020) Effect of ovarian stimulation on the expression of piRNA pathway proteins. *PLOS ONE*. 15(5).
 79. Scott L. (2003) Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online*. 6(2), 201-214.
 80. Sedláčková T., Zídková J., Brázdová A., Melčová M., Škop V., Cibulka J. a Ulčová-Gallová Z. (2010) Protilátky proti spermii. *Chem. Listy*. 104, 3-6.
 81. Shoukir Y., Chardonens D., Campana A., Sakkas D. (1998) Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence?. *Hum Reprod*. 13(6), 1632-1637.
 82. Schmid J., Kirchengast S., Vytiska-Binstorfer E., Huber J. (2004) Infertility caused by PCOS—health-related quality of life among Austrian and Moslem immigrant women in Austria. *Human Reproduction*. 19(10), 2251–2257.
 83. Simon A., Safran A., Revel A., Aizenman E., Reubinoff B., Porat-Katz A., Lewin A., Laufer N. (2003) Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertil Steril*. 79(6), 1434-1438.
 84. Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. *Metody molekulární biologie*. 1. vydání, Brno, Masarykova univerzita, 2005, 194 strán. ISBN 80-210-3841-1.
 85. Talwar L.C.P, Sindhu S.G. (2012) Step by Step: Protocols in Clinical Embryology and ART. *JP Medical Ltd*. s. 285.
 86. Tang J., Liu B., Li N., Zhang M., Li X., Gao Q., Zhou X., Sun M., Xu Z., Lu X. (2020). „Development of Renin-Angiotensin-Aldosterone and Nitric Oxide System in the Fetus and Neonate“. *Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology*. s. 643–662.
 87. Thurston L., Abbara A., Dhillon W.S. (2019) Investigation and management of subfertility. *J Clin Pathol*. 72(9), 579-587.
 88. Timofeeva A.V., Chagovets V.V., Drapkina Y.S., Makarova N.P., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. (2019) Cell-Free, Embryo-Specific sncRNA as a Molecular Biological

- Bridge between Patient Fertility and IVF Efficiency. *International journal of molecular sciences*. 20(12), 2912.
89. Timofeeva A., Drapkina Y., Fedorov I., Chagovets V., Makarova N., Shamina M., Kalinina E., Sukhikh G. (2020) Small Noncoding RNA Signatures for Determining the Developmental Potential of an Embryo at the Morula Stage. *Int J Mol Sci*. 21(24), 9399.
 90. Tomášová R., Pavlíková G., Tomka M., Hojsíková I. (2015) Odysea čítania DNA. *NewsLab*. 2(1), 7-10.
 91. Toporcerová S. a kol. Základy reprodukčnej medicíny. BEKI Design. 2015, 406 strán. ISBN 978-80-89522-04-0.
 92. Toporcerová S., Špaková I., Šoltys K., Klepcová Z., Kl'oc M., Bohošová, J., Trachtová K., Peterová L. Mičková H., Urdzík P., et al. (2022) Small Non-Coding RNAs as New Biomarkers to Evaluate the Quality of the Embryo in the IVF Process. *Biomolecules*. 12(11), 1687.
 93. Trávník P. Klinická embryologie. Mladá fronta a. s., 2018, 501 strán. ISBN 978-80-204-4940-5.
 94. Trávník P. Klinická fyziologie a lidská reprodukce. Grada Publishing, a.s., 2022, 314 strán. ISBN 978-80-271-1275-3.
 95. Tunç E., Ilgaz S. (2022) Robertsonian translocation (13;14) and its clinical manifestations: a literature review. *Reprod Biomed Online*. 45(3), 563-573.
 96. Valojerdi M.R., Karimian L., Yazdi P.E., Gilani M.A., Madani T., Baghestani A.R. (2006) Efficacy of a human embryo transfer medium: a prospective, randomized clinical trial study. *J Assist Reprod Genet*. 23(5), 207-212.
 97. Van Blerkom J., Runner M.N. (1984) Mitochondrial reorganisation during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *American Journal of Anatomy*. 171(3), 335–355.
 98. Van Blerkom J., Davis P., Merriman J., Sinclair J. (1995) Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Human Reproduction*. s. 429–461.
 99. Walker M.H., Tobler K.J. (2022) Female Infertility. In: StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.
 100. Wang X., Falcone T., Attaran M., Goldberg J.M., Agarwal A., Sharma R.K. (2002) Vitamin C and vitamin E supplemaentation reduce oxidative stressinduced

- embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril.* 78(6), 1272-7.
101. Youssef A., Kandil M., Makhoulf A., Habib D., Mesiano S., Liu J. and others. (2016) Impact of incubation temperature on mouse embryo development. *Fertility and Sterility.* 105(2), 45.
102. Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., Dyer S., et al. (2017) The International Glossary on Infertility and Fertility Care. *Human Reproduction* (Oxford, England). 32(9), 1786-1801.
103. Zhang H., Zhang F., Chen J., Li M., Lv X., Xiao Y., Zhang Z., Hou L., Lai Y., Xiao W., Zhang A., Fu H., Zhou J., Diao F., Shi A., Su Y., Zeng W., Wu L., Li J. (2021) PiRNA Pathway Is Essential for Generating Functional Oocytes in Golden Hamster. *Nature Cell Biology.* 23, 1013–1022.

Internetové zdroje

104. Costa-Borges N., Mestres E., Garcia M., Vanrell Y., Rink K., Levtonov M., Calderón G. Trophoectoderm biopsy of blastocysts using the Eppendorf TransferMan® 4m micromanipulators assisted by a laser system. *APPLICATION NOTE*, 2016, No. 351, p. 4. [online] [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/161076/Eppendorf_Cell-Technology_Application-Note_351_TransferMan-4m_Biopsy-Tip-I_Trophectoderm-biopsy-blastocysts-Eppendorf-TransferMan-4m-micromanipulators-assistedlaser-system.pdf>.
105. Enzymy používané v molekulární biologii. [online]. Posledná revízia 2010 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/sci/podzim2010/Bi7015/um/enzymy_pro_MB.pdf>.
106. Inner Cell Mass [online]. [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <<https://discovery.lifemapsc.com/in-vivo-development/inner-cell-mass/inner-cell-mass>>.
107. KIDScore™ D5 [online]. Posledná revízia 08.2021 [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://www.vitrolife.com/globalassets/support-documents/product-manuals/czech/kidscore_d5_appendix_cs-cz.pdf>.
108. Klepcová, Z., Peterová, L., Toporcerová, S., Rabajdová, M. Diagnostický potenciál nekódujúcich RNA v kultivačnom médiu embryí. *Laboratórna diagnostika,*

- 2021, XXVI. 1, s. 115-122. [online] [cit. 2023-01-25]. Dostupné z: <[file:///C:/Users/domin/Downloads/Laborat%C3%B3rna%20Diagnostika%20XXVI_1_2021%20115%E2%80%93122%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/domin/Downloads/Laborat%C3%B3rna%20Diagnostika%20XXVI_1_2021%20115%E2%80%93122%20(1).pdf)>.
109. PGT-A, PGT-M, and PGT-SR, WHAT DO ALL OF THESE ACRONYMS MEAN? [online]. Posledná revízia 09.2018 [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <<https://ormgenomics.com/2018/09/20/pgt-what-does-it-all-mean/>>.
110. Next Generation Sequencing (NGS) [online]. [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <<https://www.thermofisher.com>>.
111. PGT-M: Preimplatační genetické testování monogenních onemocnění [online]. [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <<https://www.repromeda.cz/poskytovana-pece/genetika/preimplantacni-geneticka-diagnostika/pgd-monogennich-chorob/>>.
112. PGT-SR: Strukturní chromozomové vady [online]. [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <<https://www.repromeda.sk/poskytovana-starostlivost/genetika/pgd-preimplantacna-geneticka-diagnostika/pgt-t-translokacie/>>.
113. Polymerase Chain Reaction (PCR) Process Steps [online]. Posledná revízia 05.2022 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <<https://www.coleparmer.com/tech-article/pcr-process-steps-explained>>.
114. Sekvenovanie DNA [online]. [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <<https://biopedia.sk/molekularna-biologia/sekvenovanie-dna>>.
115. Sekvenovanie novej generácie [online]. [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <<https://biopedia.sk/molekularna-biologia/sekvenovanie-novej-generacie>>.
116. What is PGT-SR? [online]. [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <<https://pacgenomics.com/pgt/pgt-sr/>>.
117. What is Pyrosequencing? [online]. Posledná revízia 10.2018 [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <<https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Pyrosequencing.aspx>>.
118. World Health Organization (WHO) [online]. (2018) International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11) Geneva. Dostupné z: <https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1>.