

Svoluji k zapůjčení mé diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika eukaryot

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Oldřiška Jandová

Tripolární dělení – morfokinetické hodnocení embryonálního vývoje pomocí
time-lapse systému

Tripolar cell cleavage – morphokinetic evaluation of the human embryo
development by the time-lapse system

Diplomová práce

Vedoucí práce: MVDr. Daniel Hlinka, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Beáta Kaľatová

Praha, 2018

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

V Praze

Jandová Oldřiška

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce MVDr. Danielu Hlinkovi Ph.D. a konzultantce RNDr. Beátě Kařatové za ochotu, nesmírnou trpělivost, instrukce, připomínky a rady k této práci a umožnění její realizace. Dále bych také chtěla poděkovat celému personálu Prague Fertility Center za jeho ochotu a vstřícnost. Poděkování patří také Ing. *et* Ing. Anetě Mazouchové, Ph.D. za pomoc při statistické analýze získaných dat. Především bych chtěla poděkovat mé rodině za její velkou podporu a trpělivost během celého studia.

Abstrakt

Princip time-lapse systému je založen na kontinuálním snímání vývoje preimplantačního embrya a posuzování jeho morfologie. To je výhodné k posouzení kvality a implantačního potenciálu embryí, která jsou následně podle určitých stanovených kritérií hodnocena. To dává možnost vybrat nejkvalitnější embryo, které bude implantováno do dělohy matky během embryotransferu. Tento systém nám také umožňuje detekovat případné abnormality ve vývoji embryí, což je velmi důležité, protože vznik abnormalit v časném buněčném dělení embrya je poměrně častý děj. Morfologické hodnocení embryí udává vysokou frekvenci výskytu tripolární mitózy během tohoto časného vývoje embryí. Výsledkem dělení jsou tři blastomery místo dvou, což je spojeno s nepravidelným rozchodem chromozomů, kdy každá z těchto buněk může obsahovat jiný počet chromozomů. V případě, kdy je k pozorování embrya využito konvenčního testování, kterým se pozoruje morfologie embryí ve větších časových intervalech, může dojít k tomu, že změny spojené s tripolární mitózou nejsou vůbec detekovány a taková embrya se pak falešně jeví jako dobře prosperující a jsou často vybrána pro transfer. To může mít závažné důsledky v případě implantace, protože tyto embrya jsou nejen aneuploidní, ale mohou vést k uniparentální dizomii.

Celkem bylo vyšetřeno 429 pacientek a pomocí time-lapse systému morfologicky vyhodnoceno 3579 embryí. V tomto celkovém souboru byla pozitivně identifikována tripolární mitóza v 95 (2,65 %) případech u 69 (16,08 %) pacientek. Následně bylo provedeno statistické hodnocení vlivu vybraných parametrů na vznik tripolární mitózy. Soubor byl rozdělen podle několika kritérií k porovnání výsledku analýzy. Testován byl věkový faktor, čas detekce tripolární mitózy a typ media.

Výsledky této práce byly porovnány s odbornými publikacemi, které se zabývaly detekcí tripolární mitózy pomocí time-lapse systému. Vliv zkoumaných parametrů na vznik tripolární mitózy nebyl statisticky prokázán.

Klíčová slova: embryo, time-lapse monitorování, asistovaná reprodukce, tripolární mitóza

Abstract

The principle of time-lapse system is based on the continuous sensing of the development of the pre-implantation embryo and the assessment of its morphology. This is advantageous in assessing the quality and implantation potential of embryos, which are subsequently evaluated according to certain established criteria. This gives the opportunity to select the highest quality embryo to be implanted into the mother's womb during embryo transfer. This system also allows us to detect any abnormalities in embryo development. This is very important, because the occurrence of abnormalities in early embryonic cell division is quite common. Morphological evaluation of embryos indicates a high incidence of tripolar mitosis during this early embryo development. The result of this division is three blastomers instead of two, which is associated with an irregular chromosome separation, each of them may contain a different number of chromosomes. In the case where conventional embryo observation is used to observe embryo morphology at longer intervals, it may be that the changes associated with tripolar mitosis are not detected at all, and such embryos appear to be falsely prosperous and are often selected for transfer. This can have serious consequences in the case of implantation, because these embryos are not only aneuploid but can lead to uniparental disomy.

In total, 429 patients were examined and 3579 embryos were evaluated morphologically using the time-lapse system. In this overall set, tripolar mitosis was positively identified in 95 (2,65 %) cases in 69 (16,08 %) patients. Subsequently, a statistical evaluation of the influence of selected parameters on the formation of tripolar mitosis was performed. The file was divided according to several criteria to compare the analysis result. Age factor, time of tripolar mitosis detection and media type were tested.

The results of this work was compared with the conclusions of the expert articles dealing with the detection of tripolar mitosis using the time-lapse system. The influence of the studied parameters on the formation of tripolar mitosis was not statistically proven.

Keywords: human embryo, time-lapse monitoring, assisted reproduction, tripolar mitosis

Obsah

Seznam použitých zkratek	9
Úvod.....	11
1 Přehled literatury	12
1.1 IVF	12
1.2 Selekcce	13
1.3 Kvalita oocytu	13
1.4 Kvalita zygoty	15
1.5 Kvalita embrya	16
1.5.1 Kultivace do 3. dne	17
1.5.2 Prodloužená kultivace	17
2 Mozaicismus	18
2.1 Vznik v meióze	19
2.1.1 Uniparentální dizomie	20
2.2 Vznik v mitóze	21
3 Tripolární mitóza	23
3.1 3PN zygota	24
3.2 2PN zygota	25
3.3 Mechanismy vzniku tripolární mitózy	26
3.3.1 Centrozomální cyklus.....	27
3.3.2 Amplifikace centrozomu	27
3.3.3 Mechanismy bránící vzniku tripolární mitózy	29
3.3.4 Kontrolní body buněčného cyklu	29
4 Time-lapse systém	31
5 Cíle práce	37
6 Materiál a metody	38
6.1 Pacienti	38
6.2 Hormonální stimulace	38
6.3 Kultivace	39
6.3.1 Kultivační media	39
6.4 Hodnocení embrya	39
6.4.1 Time-lapse systém – Primo Vision	39
6.5 Výběr embrya pro embryotransfer	40
6.6 Embryotransfer.....	41
6.7 Metody statistického zpracování dat	41
7 Výsledky	42

7.1	Time-lapse systém – Primo Vision	42
7.2	Analýza dat.....	45
7.2.1	Hodnocení pacientek v závislosti na využití vlastního či darovaného oocyty a věku....	45
7.2.2	Hodnocení dle věku a vzniku tripolární mitózy	47
7.2.3	Hodnocení pacientek s vlastním oocytem dle věku a vzniku tripolární mitózy.....	49
7.2.4	Hodnocení vzniku tripolární mitózy podle typu kultivačního media.....	51
7.2.5	Čas detekce tripolární mitózy.....	52
8	Diskuze	54
8.1	Tripolární mitóza.....	54
8.2	Důsledky tripolární mitózy	55
8.3	Výskyt tripolární mitózy	56
8.4	Věk matky	57
8.5	Medium	58
8.6	Time-lapse systém.....	58
8.7	Bezpečnost time-lapse systému.....	60
9	Souhrn.....	61
10	Seznam použité literatury	63

Seznam použitých zkratek

APC/C	anaphase promotoring complex/cyclosome
ART	metody asistované reprodukce, assisted reproductive technique
BCRA1/2	breast cancer gene 1/2
CDK	cyklin-dependentní kináza, cyclin-dependent kinase
DNA	deoxyribonukleová kyselina, deoxyribonucleic acid
EEVA	Early Embryonic Life Assessment
ESHRE	Evropské společenství pro lidskou reprodukci European Society of Human Reproduction and Embryology
GV	germinální váček, germinal vesicle
hCG	lidský choriový gonadotropin, human chorionic gonadotropin
hUPD	uniparentální heterodizomie, uniparental heterodisomy
ICM	vnitřní buněčná masa, inner cell mass
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie, intracytoplasmic sperm injection
iUPD	uniparentální izodizomie, uniparental isodisomy
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
MCC	mitotický kontrolní komplex, mitotic checkpoint complex
MI	meióza I, meiosis I
MII	meióza II, meiosis II
MTOC	mikrotubuly organizujícího centra, microtubule-organizing centre
NPB	jaderné prekurzorové tělísko, nucleolus precursor body
P53	tumor protein 53
PB1	první polární tělísko, first polar body
PB2	druhé polární tělísko, second polar body
PCM	pericentriolární materiál, pericentriolar material
PGD	preimplantační genetická diagnostika, preimplantation genetic diagnosis
PLK4	polo-like kináza 4, polo-like kinase 4

PN	prvojádro, pronuclei
PV	Primo Vision
Rb protein	retinoblastomový protein, retinoblastoma protein
RNA	ribonukleová kyselina, ribonucleic acid
rRNA	ribozomální RNA, ribosomal RNA
SAC	kontrolní bod dělicího vřeténka, spindle assembly checkpoint
SET	přenos jednoho embrya, single embryo transfer
TE	trofoektoderm, trophectoderm
UPD	uniparentální dizomie, uniparental disomy

Úvod

Celosvětově dochází k nárůstu počtu neplodných párů, které vyhledávají pomoc v centrech asistované reprodukce. Metody, které asistovaná reprodukce využívá ve snaze pomoci těmto párům se neustále zdokonalují. Je to již 40 let, kdy se narodilo první dítě pomocí *in vitro* fertilizace. Od této doby bylo učiněno mnoho kroků a zavedena řada postupů, které mají zvyšovat šanci na otěhotnění. Jednou z možností, jak zvýšit úspěšnost léčby byl přenos více embryí do dělohy matky. Avšak tento postup přinášel riziko vzniku vícečetného těhotenství, které je spojeno s větším rizikem pro matku i pro potomky. Pro eliminaci těchto rizik byla navržena účinná strategie přenosu jediného embrya. Kvůli tomu je však kladen větší důraz na kvalitu přenášeného embrya.

Jedním z novějších přístupů je kontinuální sledování vývoje embryí pomocí time-lapse systému, jenž spočívá v pořizování snímků v přesně definovaných časových úsecích a tím jsou získávány informace pro selekci toho nejkvalitnějšího embrya pro přenos. To je nejen výhodné pro určení kvality embryí, ale pro odhalení případných abnormalit, které se vyskytují velmi často během časného vývoje embryí. To může být také využito například k detekci tripolární mitózy, která byla pozorována u časně se vyvíjejících embryí. Původně se předpokládalo, že tripolární mitóza se vyskytuje u zygot se třemi prvojádry, které vznikají v důsledku triploidní fertilizace. Avšak byla pozorována i u normálně oplodněných zygot, kdy můžeme pozorovat zygotu se dvěma prvojádry, která vytváří při buněčném dělení embrya tři buňky místo dvou dceřiných. Taková embrya jsou geneticky abnormální a jejich výběr pro transfer může mít závažné důsledky v případě implantace. Při normálním konvenčním pozorování vývoje embryí jsou velmi často taková embrya preferována pro přenos. To nejen kvůli jejich dobré morfologii ale také je jejich lichý počet buněk chybně spojován s dalším buněčným dělením embrya. Je proto velmi důležité, aby taková embrya byla identifikována a vyřazena z výběru pro transfer.

Time-lapse systém poskytuje možnost posouzení vývojové kompetence a případných abnormalit embryí. Z tohoto důvodu je proto považován za jeden z nejlepších diagnostických prostředků v léčbě neplodnosti.

1 Přehled literatury

1.1 IVF

Neplodnost je v dnešní době globální a multietnický problém, který postihuje přibližně 50 až 70 milionů párů v reprodukčním věku po celém světě (Humphries *et al.*, 2016). Neplodnost je klinicky definovaný stav, kdy nelze dosáhnout koncepce při nechráněném pohlavím styku po dobu jednoho roku. Mladý zdravý fertlní pár má během tohoto období šanci dosáhnout koncepce až 90 % (Van Voorhis *et al.*, 2007). Proto v dnešní době většina neplodných párů využívá metody asistované reprodukce (ART). Velmi důležitou metodou je *in vitro* fertilizace (IVF), kterou můžeme definovat jako proces, jehož výsledkem je fúze rodičovských gamet, oocytu a spermie v podmínkách *in vitro* (Neri *et al.*, 2014). Bez ohledu na příčinu neplodnosti dochází k velkému nárůstu počtu cyklů IVF po celém světě, a to již od roku 1978, kdy se narodilo první dítě pomocí IVF, Luisa Brownová (Niakan *et al.*, 2012; Van Voorhis *et al.*, 2007). Udává se, že přibližně 1 z 50 narozených dětí ve Švédsku, 1 z 80 narozených dětí v USA a 1 z 60 dětí v Austrálii je výsledkem IVF. *In vitro* fertilizace zahrnuje několik procesů od stimulace vaječnicků hormony, aspiraci oocytů, fertilizaci, kultivaci až po přenos embryí do dělohy matky. Fertilizace může být dosažena několika způsoby, jednou z možností je společná kultivace oocytu se spermii nebo pomocí novějšího a častěji používaného postupu ICSI – intracytoplazmatické injekce spermie (Van Voorhis *et al.*, 2007). Při této mikromanipulační metodě je do cytoplazmy oocytu vpravena spermie tenkou jehlou (Tesarik *et al.*, 1996).

Přibližně v polovině případů je žena ve věku 35 let nebo starší, což je také odrazem dnešní společnosti, kdy je poměrně časté odkládání založení rodiny na pozdější období života. Jednou z mnoha potencionálních příčin nízké úspěšnosti IVF u těchto žen je zvýšená incidence numerických chromozomálních abnormalit embryí. V důsledku toho se přistupuje k PGD – preimplantační genetické diagnostice, což je jedna z možností, jak zvýšit úspěšnost IVF. Z embrya je odebrána blastomera, která je geneticky analyzována. Následně embrya, která jsou pomocí této metody identifikována jako abnormální jsou vyřazena. Naopak embrya s normální genetickou konstitucí jsou vybrána k implantaci do dělohy matky. I přes všechny možnosti, které dnešní centra asistované reprodukce nabízejí, bohužel není možné v některých případech kompenzovat nižší plodnost spojenou například s přibývajícím věkem (Mastenbroek *et al.*, 2007).

1.2 Selekcce

Uplynulo již 40 let od zavedení IVF, od této doby byly učiněny výrazné pokroky ve všech metodách asistované reprodukce, a to především v metodách, které se podílejí na hodnocení kvality embryí (Bączkowski *et al.*, 2004). V současnosti je v klinické praxi podporována strategie přenosu jediného embrya (SET). Jedná se o účinnou strategii, jak zabránit vícečetnému těhotenství, což je jeden z hlavních problémů asistované reprodukce. Vícečetné těhotenství přináší mnoho rizik, jak pro matku, tak pro plody. Příkladem může být zvýšené riziko předčasného porodu, perinatální mortality, růstové retardace a všeobecného neprospívání. U matky pak hrozí častěji rozvoj hypertenze, preeklampsie a eklampsie (Hacker *et al.*, 2015; Kirkegaard *et al.*, 2013). Transfer jediného embrya u pacientek také poskytuje schopnost kvantifikovat životaschopnost embryí (Gardner *et al.*, 2015). Proto je především kladen vysoký důraz na kvalitu přenášených embryí, která jsou morfologicky a biochemicky hodnocena.

Biochemické metody pro posouzení kvality lidských gamet a lidských embryí jsou popsány na základě analýzy folikulární tekutiny nebo metabolické aktivity embrya. To zahrnuje především měření pyruvátu, glukózy a spotřeby kyslíku. Tato hodnocení jsou však časově náročná, což výrazně omezuje jejich aplikaci v laboratořích IVF (Kirkegaard *et al.*, 2013). I přestože existuje řada faktorů, které výrazně ovlivňují úspěšnost výsledku cyklu IVF jako jsou například počet aspirovaných oocytů, zralost oocytů, receptivita endometria či složení média v němž jsou embrya kultivována, je morfologie embrya považována za jednu z nejdůležitějších (Ebner *et al.*, 2003; Lundin *et al.*, 2001; Sunde *et al.* 2016). Proto je morfologické hodnocení gamet a embryí primárním nástrojem pro získání informací o jejich kvalitě a následném implantačním chování (Kirkegaard *et al.*, 2013). Pro techniky asistované reprodukce a úspěšnost programů IVF je proto klíčové pochopení vývoje preimplantačního embrya (Niakan *et al.*, 2012).

1.3 Kvalita oocytu

Ovariální stimulace je prováděna podle standardizovaného protokolu. Pomocí vaginální ultrasonografie je sledována velikost a počet dozrávajících folikulů. Pokud folikuly dosáhnou

doporučené velikosti je indukována ovulace pomocí hCG. Aspirace je prováděna tenkou jehlou 36-38 hodin od stimulace hCG pod ultrasonografickou kontrolou. Oocyty jsou kultivovány v konstantním prostředí s kultivačním médiem, 6% CO₂ atmosférou, při teplotě 37°C, pokryté minerálním olejem (Hardarson *et al.*, 2013; Lundin *et al.*, 2001; Tesarik *et al.*, 2002).

Vzhledem k tomu, že někteří pacienti navštíví centrum asistované reprodukce z důvodu určité obavy o nosičství dědičného onemocnění a snaže zamezit přenosu takového onemocnění na svého potomka, je v důsledku toho prováděna preimplantační genetická diagnostika k detekci monogenních chorob. To je také nutné brát v úvahu při hormonální stimulaci, kdy je pro zajištění úspěšnosti cyklu IVF získat dostatek oocytů. Jelikož je nutné vyloučit embrya, která nesou mutovaný gen či embrya s aneuploidii. Transfer aneuploidních embryí by jednak nebyl úspěšný nebo by vedl k pozdějšímu spontánnímu abortu. V případě strukturních chromozomových vad je navíc nutné brát v úvahu fakt, že nositel balancované translokace produkuje část gamet s nebalancovanými translokacemi. V důsledku toho je nutné získat co největší množství oocytů, které je nutné fertilizovat vzhledem k tomu, že ve výsledku je získán jen velice omezený soubor kvalitních a geneticky normálních embryí (Trávník.; 2015).

Oocyty, které jsou získány od pacientek po kontrolované ovariální hyperstimulaci, vykazují různé stupně meiotické zralosti (Ebner *et al.*, 2003). Meiotický proces, který se podílí na determinaci oocytu je velice dlouhý, složitý a nesouvislý (Adhikari *et al.*, 2014). Přibližně 10 % oocytů se při morfologickém vyšetření nachází v profázi prvního meiotického dělení, které je charakteristické přítomností velkého jádra uvnitř cytoplazmy primárního oocytu v tzv. germinálním váčku (GV), ve kterém jsou chromozomy značně dekondenzovány (Adhikari *et al.*, 2014; Gardner *et al.*, 2013). Tyto primární oocyty nelze použít pro IVF, jelikož obsahují diploidní sadu chromozomů a jsou tak přenesena do maturačního média (Chian *et al.*, 2000; Ebner *et al.*, 2003). Jejich stupeň zralosti je následně hodnocen v určitých časových intervalech (Chian *et al.*, 2000). Přibližně u 5 % oocytů není vizualizován GV ani vytěsněné první polární tělíčko, tyto oocyty jsou obecně klasifikovány v metafázi prvního meiotického dělení (Gardner *et al.*, 2013). Rozpad GV je prvním morfologickým znakem návratu do meiózy. Po rozpadu GV dochází k tvorbě dělicího vřeténka, kondenzaci a vyrovnání chromozomů do ekvatoriální roviny. První meiotické dělení (MI) je pak následně dokončeno extruzí prvního polárního tělíska (Adhikari *et al.*, 2014). Tzv. sekundární oocyt je zastaven v metafázi druhého meiotického dělení (MII) až do oplodnění (Adhikari *et al.*, 2014). Je prokázáno, že oocyty MII dobré morfologie by měly mít jasnou, středně granulovanou cytoplazmu, malý perivitellinní prostor, intaktní první pólóvé tělíčko a bezbarvou zonu pellucidu. Více než 50 % oocytů však

vykazuje nejméně jednu morfológickou abnormalitu (Ebner *et al.*, 2003). Pro další manipulaci jsou kumulární buňky, které obklopují oocyt odstraněny pomocí hualuronidázy (Palermo *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 2013). Takto připravené jsou k dispozici pro intracytoplazmatickou injekci spermie (ICSI). Do každého oocytu MII je injekčně vpravena spermie a následně jsou přeneseny do kultivačního média, kde je nadále morfológicky hodnocen jejich vývoj (Chian *et al.* 2000).

1.4 Kvalita zygoty

Posuzování úspěšnosti fertilizace je nutné načasovat dle metody asistované reprodukce, která byla použita. Kontrola fertilizace se provádí obvykle 16 hodin po ICSI a 18 hodin po standardní IVF. Kratší doba fertilizace u ICSI je dána tím, že nezahrnuje procesy, které se uplatňují u klasické IVF jako jsou akrozomová reakce a vazba spermie na zonu pellucidu (Gardner *et al.*, 2013; Ebner *et al.*, 2003; Lundin *et al.*, 2001). V tomto období dochází k extruzi druhého polární tělíska a toto místo extruze pak definuje polární osu prvního buněčného dělení. Centrálně pak dochází k formaci samčího prvojádra, zatímco samičí prvojádro je lokalizováno v blízkosti druhého polárního tělíska (Gardner *et al.*, 2013). Spermie dodává centriolu, která má důležitou úlohu v dalším vývoji a kontrole mikrotubulů. Mikrotubuly zprostředkují migraci samičího prvojádra k haploidnímu samčímu prvojádro. Tím jsou prvojádra lokalizována ve středu buňky a zarovnávají se, následně dochází k rozpadu membrán a fúzi genetického materiálu. Proces fertilizace je dokončen a vývoj embrya začíná buněčným dělením (Montag; 2014).

V tomto stádiu dochází k mnoha morfológickým změnám, z nichž mnohé zahrnují změny, které lze prokázat jednoduchým neinvazivním mikroskopickým pozorováním. Kvalita zygoty je posuzována na základě tzv. Z – skóre, kdy se nejprve hodnotí zarovnání a velikost prvojader. Velký rozdíl ve velikosti prvojader či jejich nedostatečnému zarovnání na středu buňky je spojováno se špatným vývojovým potenciálem a schopností implantace. (Scott *et al.*, 2000; Ebner *et al.*, 2003). Dalším parametrem pro Z – skóre je přítomnost cytoplazmatického halo, které vzniká, když jsou mitochondrie a další cytoplazmatické komponenty taženy mikrotubuly z periferie do centrální oblasti (Montag 2014). Halo pozitivní zygoty mají symetricky umístěné homogenní halo podél kortexu cytoplazmy. Některé studie však nepřisuzují užitečnost použití cytoplazmatického halo jako markeru pro posouzení kvality embrya (Salumets *et al.*, 2001). Jiné uvádějí vyšší kvalitu embryí pocházejících z halo

pozitivních zygot (Gardner *et al.*, 2003). Centrálním bodem hodnocení je detekce počtu, velikosti a distribuce jaderných prekurzorových tělísek (NPB), které jsou přítomny v prvojádrech. NPB jsou prekurzory jádérka, které jsou místem syntézy a zpracování rRNA a jsou proto nezbytné pro syntézu proteinů (Montag 2014; Gardner *et al.*, 2003). Klasifikace je rozdělena do 4 stupňů, kdy zygota s vysokým potenciálem vývoje a implantace by měla obsahovat stejnou velikost a počet NPB pohybující se okolo 3 až 7 a měly by být polarizovány. Stupeň 2 definuje stejný počet a velikost NPB ale s jedním jádrem zarovnaným a v druhém jádru jsou NPB rozptýleny. Zygoty 3. stupně mají nerovnoměrné počty s rozdílem více než jednoho NPB nebo velikosti NPB. Zygoty stupně 4 jsou ty, jejichž NPB nejsou zarovnané, mají velké rozměry nebo jejich pozice není v centrální části zygoty. Souhrnně data ukazují, že schopnost embrya růst *in vitro* do stádia blastocysty, která je schopná se implantovat, je přímo spojeno s morfologií zygoty (Scott *et al.*, 2000).

1.5 Kvalita embrya

Standardním postupem jsou zygoty opakovaně morfologicky vyšetřeny po 25 až 27 hodinách od ICSI či klasické IVF. V tomto časovém úseku lze pozorovat v důsledku prvního mitotického dělení embrya přítomnost dvou buněk, které nazýváme blastomery (Gardner *et al.*, 2013; Saluments *et al.*, 2003). S ohledem na rozdílnou vývojovou kinetiku, můžeme v tomto intervalu pozorovat různé stupně vývoje embryí. Jednou z možností, kterou můžeme v tomto období pozorovat, je přítomnost prvojader (PN). Je hodnoceno stádium 2PN nebo stádium 0PN, kdy dochází k rozpadu PN membrán a následně k jejich fúzi. V ideálním případě pozorujeme přítomnost 2 blastomer. V posledním případě můžeme pozorovat přítomnost více než 2 buněk (Racowsky *et al.*, 2009). Embrya, která v rozmezí 25 až 27 hodin po fertilizaci vykazují přítomnost 2 buněk, jsou označována jako embrya dobré kvality a výsledná rychlost počátečního štěpení je dána do souvislosti s jejich implantačním potenciálem (Saluments *et al.*, 2003). Kvalita embrya je dále hodnocena pozorováním optimální rychlosti štěpení po 40-44 hodinách, kdy můžeme pozorovat embryo se 4 blastomery. Další mitotické dělení pozorujeme po 68 hodinách od fertilizace, kdy embryo obsahuje již 8 blastomer. Do třetího dne vývoje, pozorujeme blastomery, které jsou zřetelně rozpoznatelné od dalších. Mezi 3. až 4. dnem kultivace *in vitro* začíná proces, který nazýváme kompaktace. Po tomto procesu přibližně 92 hodin od kultivace je velice obtížné rozlišit jednu blastomeru od druhé a pozorujeme již útvar, který se nazývá morula. Ideální morula ve 4. dnu vývoje by měla obsahovat mezi 16 a

32 buňkami. To odpovídá tomu, že došlo k dalšímu mitotickému dělení. Proces kompaktace by měl začít v 3. den kultivace, tedy ve stádiu s 8 buňkami, nicméně tento proces může být pozorován i dříve a není to spojováno s negativním dopadem na pozdější implantaci (Montag, 2014 str. 124; De Placido *et al.*, 2002). Přibližně 5. až 6. den kultivace (120 nebo 144 hodin) po ICSI se z moruly vyvíjí útvar zvaný blastocysta s patrnou dutinou blastocoelu obsahující trofoektoderm (TE) a vnitřní buněčnou masu (ICM) (Cruz *et al.*, 2012).

1.5.1 Kultivace do 3. dne

V IVF protokolech je v dnešní době kladen důraz na snížení počtu přenášených embryí, aby nedocházelo k vícečetným těhotenstvím, ale zároveň byl zachován podíl úspěšných IVF pokusů. Lze toho dosáhnout zvyšováním spolehlivosti embryonální analýzy a kultivačních systémů (De Placido *et al.*, 2002). Ve většině laboratoří IVF je zaveden protokol přenosu embrya v 2. nebo 3. den kultivace (Lundin *et al.*, 2001). Kvalita embrya v 3. den kultivace je hodnocena na základě počtu blastomer a synchronie rýhování, rozsahu fragmentace, přítomnosti jediného jádra v blastomeře a časně kompaktace (Papanikolaou *et al.*, 2016; De Placido *et al.*, 2002). Bylo zaznamenáno, že kvalita embrya koreluje s morfologií oocytů a zygoty (Lundin *et al.*, 2001). Embrya, která nejsou vybrána pro přenos do dělohy matky jsou kryokonzervována s ohledem na další cykly IVF. Kultivace embryí 2. a 3. den po oplodnění je na rozdíl od kultivace blastocysty poměrně jednoduchá. To především z důvodu náročnějších kultivačních podmínek, které kultivace do stádia blastocysty vyžaduje (De Placido *et al.*, 2002). Hlavní nevýhodou přenosu embrya ve fázi štěpení, oproti fázi blastocysty je dána skutečností, že morfologická kritéria, která podmiňují selekci embryí v 3. den jsou velmi subjektivní a méně odrážejí genetickou kvalitu embryí, než kritéria používaná v 5. den kultivace. Bylo zjištěno, že převážná část embryí, která se považují za kvalitní v 3. den kultivace mohou být aneuploidní. Pokud je vybráno jediné embryo pro přenos, tak tím se také zvyšuje pravděpodobnost přenosu chromozomálně abnormálního embrya (Papanikolaou *et al.*, 2016).

1.5.2 Prodloužená kultivace

Jednou z možností, které centra asistované reprodukce využívají je prodloužená embryonální kultivace a přenos blastocysty v 5. den vývoje (Cruz *et al.*, 2012). Kvalita embrya v 5. den kultivace je hodnocena na základě vývoje vnitřní buněčné masy a trofoektodermu. Je

důležité poznamenat, že vyšší úspěšnost IVF protokolů je spojována s přenosem embryí ve fázi blastocysty. To je dáno do souvislosti se stupněm vývoje, ve kterém se embryo nachází. Blastocysta představuje vývojový stupeň, ve kterém embryo doputuje fyziologicky do dělohy i v nestimulovaném cyklu. Prodloužená kultivace hodnotí schopnost zygoty dosáhnout stupně blastocysty *in vitro*, což může být považováno za ekvivalentní přirozenému výběru, ačkoli toto nemusí nutně odrážet schopnost embrya se úspěšně implantovat a vyvíjet (Cruz *et al.*, 2012). Na druhou stranu potenciální nevýhodou pro přenos embryí ve fázi blastocysty je to, že některá embrya nejsou schopna dosáhnout této fáze v kultuře *in vitro*. Další rizika, která plynou z použití blastocysty souvisejí se zvýšeným rizikem výskytu monozygotních dvojčat, předčasného porodu, změněný poměr pohlaví a v poslední řadě také možné epigenetické účinky na embryo v důsledku prodloužené kultivace. (Papanikolaou *et al.*, 2006; Maheshwari *et al.*, 2016).

2 Mozaicismus

Významná část lidských preimplantačních embryí produkovaných během léčby *in vitro* fertilizace obsahuje dvě či více odlišných buněčných linií. Tento jev je známý jako chromozomální mozaicismus, který je definován jako přítomnost dvou nebo více buněčných populací s různými genotypy (Munné *et al.*, 2017; Sachdev *et al.*, 2017). Jeho formy můžeme rozdělit do několika skupin. Aneuploidní mozaicismus, je definován jako směs aneuploidních buněk, kdy jsou přítomny dva různé aneuploidní genotypy. Frekvence výskytu aneuploidní mozaiky se odhaduje přibližně u 15 % embryí. Aneuploidní mozaicismus vzniká chybným mitotickým dělením embrya již zatíženého meiotickou aneuploidí nebo mitotickou nondisjunkcí v prvním buněčném dělení embrya, kdy jsou přítomny dvě dceřiné buňky s odlišnými karyotypy, z nich ani jeden není euploidní (Munné *et al.*, 2017; Sachdev *et al.*, 2017).

Nejčastější příčinou vzniku mozaicismu je však diploidně-aneuploidní varianta, která postihuje více než polovinu embryí v časném embryonálním dělení. Diploidně – aneuploidní mozaiky obsahují směs euploidních a aneuploidních buněk a obvykle vznikají v důsledku mitotické nondisjunkce. Procento abnormálních buněk v embryu je ovlivněno tím, v jaké fázi embryonálního vývoje dochází k chybě v segregaci chromozomů. Pokud k tomu dochází například v druhém mitotickém dělení embrya je přítomen větší podíl abnormálních buněk než chyby, které se vyskytnou během třetího dělení (Munné *et al.*, 2017; Sachdev *et al.*, 2017).

Další variantou je mozaicismus obsahující směs buněk, které mohou zahrnovat libovolnou kombinaci haploidních, diploidních či polyploidních buněk v rámci embrya. Příkladem může být diploidně – tetraploidní mozaika přítomná v raném embryonálním vývoji (Munné *et al.*, 2017; Sachdev *et al.*, 2017).

Poslední skupinou jsou tzv. chaotická embrya v nichž má každá buňka zdánlivě náhodnou chromozomovou sadu, jejíž frekvence výskytu se odhaduje přibližně na 25 % (Munné *et al.*, 2017; Sachdev *et al.*, 2017).

Chromozomální mozaicismus může vzniknout buď v důsledku chyb v meióze nebo v mitóze. Výsledkem chyby v meióze je gameta s abnormálním počtem chromozomů. Během chybné meiózy může vzniknout buď dizomická nebo nulizomická gameta, která vytváří spolu s haploidní gametou zygotu, která má abnormální počet chromozomů. Pokud dojde následně ke korekci během mitotického dělení embrya dochází ke vzniku mozaiky. Druhým případem je pak mozaicismus, který vzniká v důsledku chyb v mitóze během post – zygotického buněčného dělení embrya (Taylor *et al.*, 2014; Conlin *et al.*, 2010, McCoy, 2017).

2.1 Vznik v meióze

Meióza, při které vznikají haploidní gamety, zahrnuje duplikaci DNA a následně dvě po sobě jdoucí buněčné dělení, ve kterých jsou separovány homologní chromozomy (MI) a následně sesterské chromatidy (MII) (Webster *et al.*, 2017; Hassold *et al.*, 2001). Díky preimplantační genetické diagnostice, můžeme dostat výsledek jak z prvního, tak z druhého meiotického dělení. Pomocí analýzy prvního (PB1) a druhého polárního tělíska (PB2). Extrudované PB1 představuje vedlejší produkt meiózy I, zatímco PB2, které je vytěsněno po fertilizaci oocyty spermii nebo ICSI, je vedlejším produktem MII (Kuliev *et al.*, 2004). Aneuploidie je nejčastější chromozomová abnormalita, která je hlavní příčinou spontánních abortů nebo vrozených onemocnění (Sakakibara *et al.*, 2015). Vzniká především v důsledku chybné segregace chromozomů během meiózy (Hassolf *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2017). Bylo zjištěno, že k nondisjunkci může docházet jak během prvního meiotického dělení, tak v rámci druhého meiotického dělení (Webster *et al.*, 2017; Kuliev *et al.*, 2004). Chromozomální abnormality jsou převážně generovány během I. meiotického dělení v důsledku předčasné segregace sesterských chromatid. Pokud budeme hledat původ aneuploidii, zjistíme že frekvence aneuploidii maternálního původu je častější než frekvence aneuploidii paternálního

původu (Kuliev *et al.*, 2004). To je především dááno do souvislosti s věkem matky. Původ aneuploidií je zkoumán především u trizomií, jelikož většina monozomií je prenatalně letální. Můžeme však nalézat odchylky od tohoto všeobecného předpokladu. Příkladem může být Klinefelterův syndrom, který vzniká častěji paternální chybou. Naopak vznik trizomie chromozomu 16 je výhradně v důsledku aneuploidie maternálního původu. Podobně můžeme nacházet odchylky v době, kdy dochází ke vzniku aneuploidie. Příkladem je trizomie chromozomu 18, vznikající v důsledku nondisjunkce v druhém meiotickém dělení (Hassold *et al.*, 2001).

Nondisjunkce a předčasná separace sesterských chromatid jsou hlavními mechanismy, které způsobují chyby v segregaci chromozomů v meióze. Tyto chyby následně vedou ke vzniku aneuploidních gamet, které nesou abnormální počet chromozomů. A pokud jsou tyto gamety oplodněny, vznikají aneuploidní embrya (Webster *et al.*, 2017). Může ale následně docházet ke korekci trizomie či monozomie v rámci post-zygotického dělení embrya. *Trisomy rescue* a *monosomy rescue* jsou mechanismy, které přispívají ke korekci aneuploidních buněk (buď meiotického, či mitotického původu) mitotickou chybou, která navodí diploidní stav. *Trisomy rescue* zahrnuje jak mitotickou nondisjunkci, tak *anaphase lag* a vlivem těchto dějů dochází ke ztrátě trizomického chromozomu. *Monosomy rescue* je opačný mechanismus, který vede k duplikaci monozomického chromozomu (Conlin *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2014; McCoy *et al.*, 2017). Jedním z možných výsledků *trisomy rescue* a *monosomy rescue* je uniparentální dizomie, při které mitotická chyba produkuje diploidní buňku, která obsahuje buď dva homologní chromozomy otcovské, nebo dva homologní chromozomy mateřské (McCoy *et al.*, 2017).

2.1.1 Uniparentální dizomie

Uniparentální dizomie (UPD) je definována přítomností chromozomového páru, v němž oba chromozomy pocházejí od jednoho rodiče. Chromozomový pár může buď pocházet od otce tzv. paternální UPD nebo od matky maternální UPD. Uniparentální dizomie je spojena s některými případy recesivních onemocnění, mozaicismu a s poruchami genomového imprintingu (Lapunzina *et al.*, 2011). UPD je výsledkem vadné chromozomální segregace během dělení buněk a může se objevit během meiózy nebo mitózy. Nicméně převládající mechanismus, který způsobuje UPD je *trisomy rescue*. Pokud je v důsledku poruchy v meióze produkována dizomická gameta po splynutí s haploidní gametou, je pak vytvořena trizomická

zygota. Pak může docházet ke korekci trizomie tím, že je nadpočetný chromozom eliminován. Existuje více způsobů vzniku UPD. V jedné třetině případů dochází k tomu, že je eliminován chromozom z normální gamety, což vede k UPD. Druhou možností, která vede ke vzniku UPD, je fertilizace nulizomické a dizomické gamety. Třetím možným příkladem je *monosomy rescue*. Čtvrtý mechanismus je pak omezen na post-zygotickou mitózu (McCoy *et al.*, 2017; Eggermann *et al.*, 2015). Uniparentální dizomie se může vyskytovat jako heterodizomie (hUPD), kdy homologické chromozomy pocházejí od jednoho rodiče, nebo jako izodizomie (iUPD), ve kterém jsou přítomny dva identické segmenty od jednoho rodičovského homologu (Robinson *et al.*, 2000). Heterodizomie má původ v meióze (*trisomy rescue*, splynutí nulizomické s dizomickou gametou), zatímco izodizomie je výsledkem hlavně post-zygotické *monosomy rescue*. Kromě těchto mechanismů může docházet k UPD ve spojení se strukturálními chromozomálními abnormalitami, jako jsou například translokace nebo marker chromozomy (Eggerman *et al.*, 2015). hUPD a iUPD mohou způsobovat onemocnění, pokud ovlivňují gen, který je základem genomového imprintingu, což znamená odlišnou expresi genu, která závisí na rodičovském původu). iUPD může dále nezávisle na imprintingu vést ke vzniku recesivních onemocnění (Liehr, 2010).

2.2 Vznik v mitóze

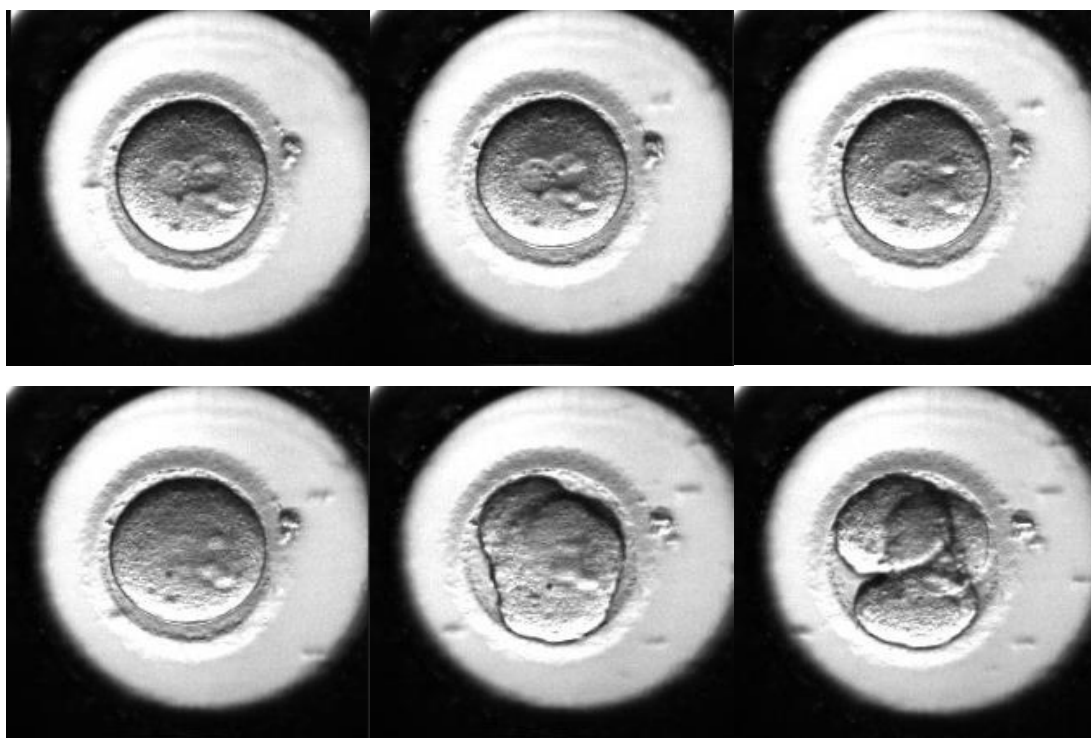
Mitóza je proces, při kterém dochází k rovnoměrnému rozdělení genetické informace buňky mateřské do dvou buněk dceřiných. V lidských preimplantačních embryích dochází velice často k mitotickým nondisjunkcím, které vedou k aneuploidii. Frekvence mitotických nondisjunkcí je nejvyšší během prvních tří buněčných dělení embrya po fertilizaci. Výsledkem toho je, že přibližně tři čtvrtiny lidských preimplantačních embryí v třetí den vývoje vykazují chromozomální mozaicismus. V pozdějších vývojových fázích je míra aneuploidie nižší. To je dáno několika mechanismy korekce aneuploidie jako je apoptóza, preferenční rozdělení aneuploidních buněk do extra-embryonální tkáně, snížení četnosti dělení aneuploidních buněk oproti euploidním buňkám tzn., že euploidní buňky proliferují s vyšší rychlostí než aneuploidní buňky. (Mantikou *et al.*, 2012; Sachdev *et al.*, 2017, Taylor *et al.*, 2014). V důsledku toho je do značné míry ovlivněn vývojový potenciál lidských preimplantačních embryí. Může docházet k zástavě vývoje nebo ztrátě embryí v pozdějších fázích vývoje. Možným následkem může být také selhání implantace nebo pokud jsou embrya schopna implantace, může se vyskytovat mozaicismus omezený na placentu (Mantikou *et al.*, 2012).

Jednou z možných chyb, která vede ke vzniku aneuploidie, je *anaphase lag*. Pokud dochází k zpomalení pohybu homologního chromozomu během anafáze nebo k nepřipojení homologního chromozomu k dělicímu vřeténku, tak tento chromozom není začleněn do jádra dceřiných buněk. To vede ke ztrátě chromozomu, což vede k monozomii jedné ze dvou dceřiných buněk (Mantikou *et al.* 2012). Zpomalené chromozomy většinou neprocházejí okamžitou degradací, ale jsou často zapouzdřeny do mikrojader – oddělené od hlavního jádra. Zde jsou chromozomy náchylné k těžkým poškozením DNA, která mohou ohrozit jejich schopnost vytvářet funkční kinetochory a podléhat řádné segregaci. Chromozomy, které jsou zapouzdřené v mikrojádrech, jsou také citlivé na katastrofický jev zvaný chromotripse. (McCoy 2017, Manikou *et al.*, 2012). Mitotické nondisjunkce jsou další příčinou vzniku aneuploidie. Výsledkem mitotické nondisjunkce je jedna buňka s monozomií, druhá s trizomií. *Anaphase lag* a nondisjunkce jsou nejčastějšími mechanismy, které vedou k aneuploidii v lidských embryích. Jiné mechanismy, které by mohly způsobit aneuploidie, jsou fragmentace chromozomů, předčasné dělení buněk, chyby v cytokinezi, buněčná fúze (Manikou *et al.*, 2012). Fragmentace chromozomů, která zahrnuje destrukci chromozomu, byla navržena jako součást *trisomy rescue*. Pokud se však v normální diploidní buňce objeví fragmentace chromozomů, vede to k aneuploidii. Naopak předčasné dělení buněk bez předchozí duplikace DNA vede ke vzniku haploidních buněk. V opačném případě polyploidní buňky mohou vznikat v důsledku vícenásobné endoreduplikace. Dalším možným mechanismem přispívajícím k aneuploidii jsou chyby v cytokinezi. Neúspěšná či asymetrická cytokineze vede k výskytu dvou jader v blastomeře nebo k tetraploidii. Mnohojaderné blastomery mohou vznikat v důsledku nedostatku mateřských molekul, které se podílejí na polarizaci, buněčném dělení a kompaktaci. Buněčná fúze blastomer je dalším možným mechanismem, který přispívá k aneuploidii. Předpokládá se, že výskyt fúze blastomer může být spojen se změnou buněčné membrány nebo se může vyskytnout po zmrazení/rozmrazení embryí. Buněčnou fúzi blastomer mohou způsobovat také další možné vlivy jako jsou například změny pH, teploty nebo osmotického tlaku. Tento děj je spojen s působením vnějších faktorů a neexistují žádné důkazy o tom, že se vyskytuje spontánně. Buněčná fúze vede ke vzniku polyploidních embryí či diploidně-polyploidní mozaiky (Mantikou *et al.*, 2012). Kromě těchto výše popsaných mechanismů, může aneuploidie či mozaicismus vznikat v důsledku tripolární či jiné abnormální mitózy (Ottolini *et al.*, 2017).

3 Tripolární mitóza

V průběhu normálního mitotického dělení vznikají z jedné mateřské buňky dvě buňky dceřiné. Tripolární mitóza je specifický případ dělení, během kterého vznikají tři dceřiné buňky namísto obvyklého počtu dvou buněk. Jiné varianty multipolární mitózy, které vedou ke vzniku více než tři buněk, jsou poměrně vzácné. Tripolární mitóza je pozorována v buňkách infikovaných lidským papilomavirem, při některých typech nádorových onemocnění a v raných vývojových fázích embryí je dávána do souvislosti se sníženým implantačním potenciálem (Zhan *et al.*, 2016; Kalatova *et al.*, 2015). Morfologické hodnocení embryí udává vysokou frekvenci výskytu multipolární mitózy během raného vývoje embryí. Největší dosavadní studie zaznamenala frekvenci 26,1 % výskytu tripolární mitózy v podmínkách *in vitro* (McCoy *et al.*, 2017; Zhan *et al.*, 2016). Výskyt tripolární mitózy může poškodit proces časného vývoje lidských embryí (Zhan *et al.*, 2016). Embrya, která vykazují tripolární mitózu mohou být morfologicky považována při konvenčním pozorování za embrya kvalitní a zvýšený počet blastomer může být chybně považován za začátek dalšího mitotického dělení (Kalatova *et al.*, 2015). Kromě toho mitotické chyby, které vznikají v časných fázích vývoje embrya, vedou ke vzniku velkého množství abnormálních buněk, zatímco abnormality, které vznikají ve stádiu blastocysty, ovlivní menší počet buněk. Embrya nejsou schopna dosáhnout stádia blastocysty, pokud se na začátku prvního mitotického dělení vyskytne tripolární mitóza. Tripolární mitóza, která je přítomna u embryí v druhém či dalším dělení, nemá tak závažné následky na další vývoj embrya (Ottolini *et al.*, 2017). Avšak to může být jednou z příčin chromozomálního mozaicismu, který se často vyskytuje u pre-implantačních embryí *in vitro*. Přítomnost mozaicismu komplikuje preimplantační genetickou diagnostiku. Vzhledem k její přítomnosti nemusí výsledek odrážet skutečnou situaci a generují se tím buď falešně negativní, či falešně pozitivní výsledky. Pokud je k PGD přistoupeno ve 3. den kultivace a je odebrána pouze jedna blastomera, která v případě falešně negativního výsledku neurčí žádnou abnormalitu, může být embryo následně vybráno pro transfer do dělohy matky, ve skutečnosti však může být aneuploidní. Naopak falešně pozitivní výsledek může selektovat embrya jinak geneticky normální. (Kalatova *et al.*, 2015; Baart *et al.*, 2005).

Obrázky č. 1–6 Na snímcích pořízených pomocí time-lapse systému je zobrazena tripolární mitóza v prvním buněčném dělení embrya.



(Fotografie autorky)

3.1 3PN zygota

Přítomnost tripolární mitózy je velice častá u zygoty, která obsahuje tři prvojádra. Takové zygoty se mohou vyvinout do morfologicky normální moruly, nicméně chromozomálně mohou být diploidní, triploidní či jinak defektní. Existuje několik příčin, kdy může vzniknout zygota se třemi prvojádry. Během fertilizace dochází k průniku dvou haploidních spermií či jediné diploidní spermie, která vznikla v důsledku chyb v prvním nebo druhém meiotickém dělení. Tato situace je poměrně běžná u konvenční IVF, která postihuje přibližně 10 % oplodněných oocytů. To je však eliminováno použitím ICSI, která se používá již ve většině cyklů IVF (Kalatova *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2017). Původním předpokladem bylo, že diandrické triploidie jsou zodpovědné za převážnou část triploidních embryí. Ukazuje se, že triploidie mateřského původu je přítomná ve více případech, než se původně předpokládalo. Další možnou příčinou je endoreduplikace ženského prvojádra, což je poměrně vzácný jev. 3PN zygoty mohou vznikat také pokud nedošlo k extruzi druhého polárního tělíska (Kalatova *et al.*, 2015).

Obrázek č. 7 Na snímku pořízeném pomocí time-lapse systému je zobrazena 3PN zygota

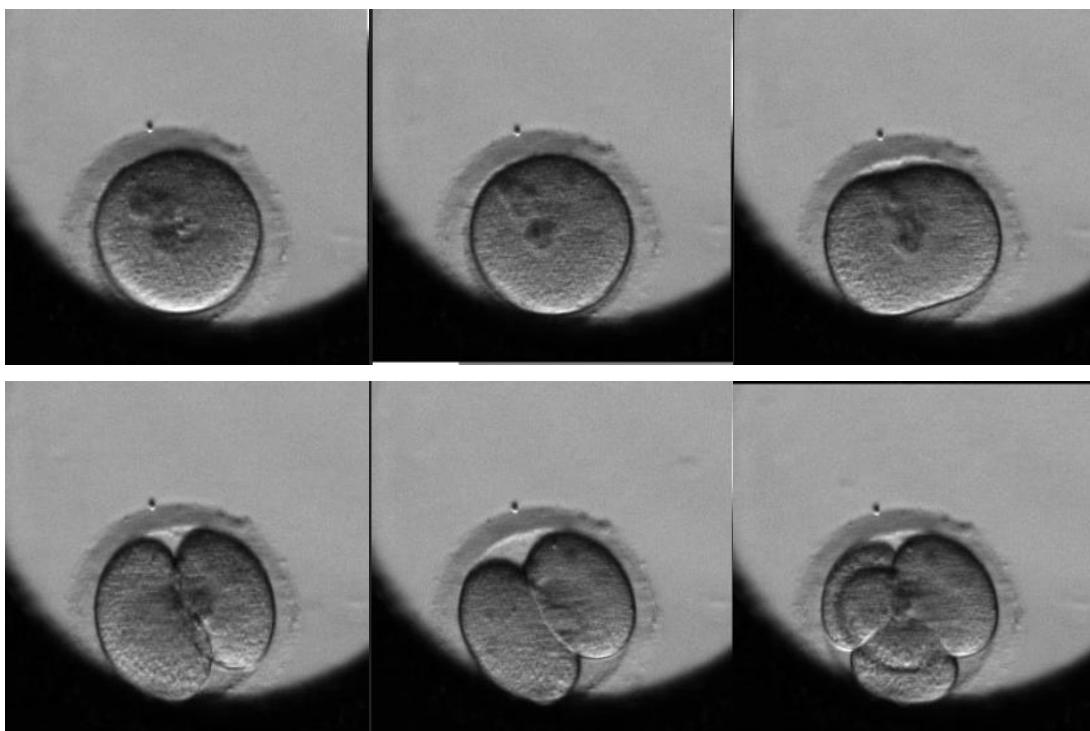


(Atlant of human embryology)

3.2 2PN zygota

Dříve se předpokládalo, že jedinou příčinou tripolární mitózy je přítomnost 3PN v zygotě. Avšak později bylo pozorováno rozdělení v prvním buněčném dělení 2PN zygoty se dvěma polárními tělísky přímo do tří blastomer (Kalatova *et al.*, 2015). Tripolární mitóza v 2PN zygotě vytváří dceřiné buňky s náhodnými hypodiploidními karyotypy (McCoy *et al.*, 2017). Následně byly doloženy důkazy o výskytu tripolární mitózy v raných lidských embryích v prvním nebo druhém buněčném cyklu. To je důkazem, že v klinické praxi není vyloučení 3PN zygot dostatečné, aby bylo zabráněno výskytu tripolární mitózy. V současnosti je detailní monitorování embryonální morfogeneze jediným spolehlivým nástrojem pro detekci chyb v mitóze, ať již přechodných či trvalých (Kalatova *et al.*, 2015).

Obrázek č. 8-14 Na snímcích, které byly pořízeny pomocí time-lapse systému je zobrazena tripolární mitóza v druhém buněčném dělení embrya.



(Fotografie autorky)

3.3 Mechanismy vzniku tripolární mitózy

Přesná kontrola počtu centrozomů je zásadní pro sestavení bipolárního dělicího vřetenka a pro přesný přenos genetického materiálu do dceřiných buněk. V současné době bylo navrženo několik mechanismů, které mohou vést k amplifikaci centrozomu – přítomnost více než dvou centrozomů (Srsen *et al.*, 2006). Aby nedocházelo k amplifikaci centrozomu, je jejich duplikace regulována proteinovými komplexy tzv. cyklin dependentními kinázami. Zejména pro duplikaci centrozomu je zapotřebí cyklin-dependentní kináza 2 (CDK2) ve spojení s cyklinem E. To představuje s největší pravděpodobností důležitý aspekt koordinace mezi duplikací centrozomu a replikací DNA (Kalatova *et al.*, 2015; Meraldi *et al.*, 2002; Fukasawa *et al.*, 2005). Selhání tohoto mechanismu má za následek amplifikaci centrozomů. Buňky, které obsahují více než dva centrozomy, jsou náchylné k multipolární mitóze (Fukasawa *et al.*, 2005; Goldinho *et al.*, 2009). Ve většině případů abnormality centrozomu nemají zřejmý a okamžitý dopad na mitózu a nadměrná amplifikace centrozomu nemusí okamžitě vést ke smrti buněk v důsledku genomové nestability pocházející z mitotického chaosu (Kalatova *et al.*, 2015)

3.3.1 Centrozomální cyklus

Centrozom je malá organela, která je obvykle lokalizována v blízkosti buněčného jádra (Fukasawa *et al.*, 2005). V živočišných buňkách má centrozom funkci tzv. mikrotubuly organizujícího centra (MTOC) a tím reguluje počet a prostorovou organizaci mikrotubulů a plní významnou roli během mitózy. Ovlivňuje vlastnosti buňky, které jsou závislé na správné funkci mikrotubulů jako je polarita, tvar buňky a buněčná motilita. Stejně tak centrozomy hrají zásadní roli v rovnoměrné segregaci chromozomů tím, že přispívají k sestavení bipolárního mitotického vřeténka během mitózy (Gondinho *et al.*, 2009; Nigg *et al.*, 2011). Centrozom se v živočišných buňkách sestává z dvojice centriol, které jsou obklopeny elektrodenzní proteinovou hmotou, která je známa jako pericentriolární materiál (PCM). Centrioly jsou od sebe strukturálně odlišné na jejich distálních koncích. Mateřská centriola obsahuje soubor distálních příloh, které jsou důležité pro ukotvení mikrotubulů, zatímco na dceřiné centriole chybí. Dceřiná centriola tyto přílohy získává v pozdní fázi G2 buněčného cyklu (Srsen *et al.*, 2006; Goldinho *et al.*, 2009; Fukasawa *et al.*, 2005). Centrioly jsou také důležité pro nábor PCM a jejich ztráta vede k jeho rozptýlení. Stejně jako DNA se centrioly duplikují semikonzervativním způsobem. Obě centrioly se oddělují a slouží jako matrice pro vytvoření nových centriol, což vede ke vzniku dvou centrozomů (Srsen *et al.*, 2006; Goldinho *et al.*, 2009). Během normálního buněčného cyklu prochází centrozom řadou strukturálních změn, které vedou k jeho duplikaci, což je nezbytné jak pro jeho funkci v metafázi, tak pro tvorbu mitotického vřeténka. Centrozomový cyklus může být rozdělen do pěti kroků: 1) segregace centrozomu (M-fáze), 2) dochází k separaci spárovaných centriol (pozdní M-fáze až G1 fáze), 3) duplikace centriol, při které dochází k tvorbě procentriol v blízkosti již existující mateřské centrioly (S-fáze), 4) zrání procentriol a rekrutování PCM (G2-fáze), 5) separace centrozomů (pozdní G2-fáze) (Gondinho *et al.*, 2009; Kalatova *et al.*, 2015; Fukasawa *et al.*, 2005).

3.3.2 Amplifikace centrozomu

Hlavní hypotézy se domnívají, že přídatný cyklus centrozomu během buněčného cyklu produkuje nadpočet centrozomů (Srsen *et al.*, 2006). Centrozomy se duplikují jednou za buněčný cyklus v koordinaci s duplikací DNA. Iniciací syntézy DNA a duplikace centrozomu je částečně zprostředkována komplexem CDK2/cyklinem E na konci G1-fáze. Při zastavení buněčného cyklu je duplikace centrozomu částečně blokována up-regulací p53 a tím je zachována číselná integrita centrozomů. P53 transaktivuje mnoho proteinů včetně p21, což je

inhibitor CDK2, a tím i duplikaci centrozomu. Pokud dojde k inaktivaci p53, centrozomy se dále duplikují, což vede k jejich amplifikaci. Hladina exprese cyklinu E a následné změny v aktivitě komplexu CDK2/cyklin E ovlivňují frekvenci amplifikace centrozomů spojenou se ztrátou či inaktivací p53. Dále byla zkoumána role dvou hlavních cyklinů A a E, které jsou v komplexu s CDK2 v duplikaci / amplifikaci centrozomu v průběhu buněčného cyklu. Cyklin A není potřebný pro zahájení duplikace centrozomu během normálního buněčného cyklu, pokud je přítomen cyklin E. Avšak v nepřítomnosti cyklinu E je důležitý cyklin A pro zahájení duplikace centrozomu. V buňkách, které jsou zadrženy v časně S-fázi buněčného cyklu, je pro indukci amplifikace centrozomu důležitý cyklin E. Nicméně může být funkčně nahrazen cyklinem A za účelem indukce amplifikace centrozomu. Naproti tomu v buňkách, které jsou zdrženy na konci G2-fáze v důsledku poškození DNA, je cyklin A důležitý k amplifikaci centrozomu bez ohledu na stav cyklinu E (Hanashiro et al., 2008; Fukasawa et al., 2005).

Amplifikace centrozomu může také nastat v důsledku abnormalit genů, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu nebo duplikaci centrozomů. Příkladem je již zmíněný *TP53* a dále *BCRA1*, *BCRA2* (Fukasawa et al., 2005 Xu et al., 1999).

Centrozomální amplifikace může proběhnout v prodloužené G2 fázi buněčného cyklu v důsledku poškození DNA (Donson et al., 2004).

Amplifikace centrozomu může také vzniknout v důsledku *de novo* tvorby acentriolárních centrozomů. Nadměrná exprese některých klíčových centrozomálních složek může vést k tvorbě centrozomů bez centriol (Fukasawa et al., 2005).

Jeden z navrhovaných mechanismů, který vede k amplifikaci centrozomu, je overduplikace centrozomu, která může vzniknout v důsledku nadměrné exprese polo-like kinázy 4 (PLK4), která se podílí na procesu duplikace centrozomu. Bylo prokázáno, že nedostatečné množství PLK4 naopak vede k tomu, že centrioly nejsou schopny nukleovat mikrotubuly (Anderhub et al., 2012; Ottolini et al., 2017).

Amplifikace centrozomu může být výsledkem i chybné cytokineze, což vede k zdvojení genomu i počtu centrozomů. Celkový počet centrozomů generovaných v tomto mechanismu by měl být vždy sudý a doprovázený amplifikací genomu. Dalším mechanismem může být nesprávné rozdělení spárovaných centriol. Centrioly se obvykle rozdělují pouze v době duplikace. Pokud je narušena kontrola včasného oddělení páru centriol nebo mechanismus

párování centriol, dochází k nekontrolovanému rozdělení a každá z těchto centriol může tvořit jednotlivé centrozomy (Fukasawa *et al.*, 2005).

3.3.3 Mechanismy bránící vzniku tripolární mitózy

Existuje několik mechanismů, které potlačují vznik multipolární mitózy v buňkách s amplifikovanými centrozomy. Tyto mechanismy podporují vznik bipolárního mitotického vřeténka několika způsoby. Jednou z možností je eliminace amplifikovaných centrozomů. Buňky mohou odstranit všechny nadbytečné centrozomy a tím vytvořit bipolární mitotické vřeténko. Dalším mechanismem je inaktivace nadpočetných centrozomů. Výsledkem jsou pak dva funkční centrozomy, které v buňce plní funkci MTOC. Může také docházet k tomu, že amplifikované centrozomy jsou asymetricky rozděleny tak, aby jedna dceřiná buňka obsahovala jeden centrozom a tvořila během následující mitózy bipolární mitotické vřeténko. Poslední a velmi časný mechanismus vede ke shlukování centrozomů. Toto je uskutečněno pomocí kontrolního bodu dělicího vřeténka – SAC. Tento kontrolní bod buněčného cyklu detekuje, zda jsou kinetochory správně připojeny k mikrotubulům dělicího vřeténka. Dokud nedojde ke korekci nesprávného připojení, pozastavuje kontrolní bod dělicího vřeténka v metafázi před vstupem do anafáze. V tomto období má buňka možnost shlukovat amplifikované centrozomy. Studie se domnívají, že kontrolní bod dělicího vřeténka (SAC) je jedním z nejdůležitějších mechanismů, které zabraňují multipolární mitóze, která vzniká v důsledku amplifikace centrozomů (Godinho *et al.*, 2009).

3.3.4 Kontrolní body buněčného cyklu

Morfologické hodnocení vývoje embryí ukazuje, že výskyt tripolární mitózy je detekován v prvních třech cyklech dělení embrya. Navíc výskyt abnormální mitózy v prvních třech děleních je korelován s vývojovou zástavou embrya před vznikem blastocysty, zvýšenou mírou vzniku aneuploidii chromozomů a špatnými klinickými výsledky po transferu takového embrya. Většina takových embryí je zastavena ve 4. až 5. dnu po fertilizaci před kompaktací a přechodem ze stádia moruly do blastocysty (Ottolini *et al.*, 2017). To je dáno tím, že embryonální genom je do značné míry neaktivní až do stádia osmi buněk a počáteční vývoj embrya je výhradně pod kontrolou mateřských RNA a proteinů, které jsou přítomny v ooplazmě oocyty (McCoy *et al.*, 2017). Před aktivací embryonálního genomu nejsou

kontrolní body buněčného cyklu plně funkční. Kvůli tomu dochází ke genetické nestabilitě, která je také často pozorována v lidských nádorových buňkách. Proto je možné, že abnormální buňky, které jsou přítomny v prvních třech dělení před aktivací embryonálního genomu, vstupují do mitózy a produkují dceřiné buňky s aberantními chromozomálními konstitucemi (Kalatova *et al.*, 2015).

Kontrolní body buněčného cyklu zajišťují správné rozdělení buněk tím, že ověřují, zda byly procesy v každé fázi buněčného cyklu správně dokončeny před vstupem buňky do další fáze. Pokud dojde k chybě, zastaví se celý buněčný cyklus do té doby, než dojde k opravě. Pokud není možné opravu uskutečnit, tak buňka směřuje k apoptóze. Funkční kontrolní body buněčného cyklu se nachází ve fázi G1, G2 a v metafázi tzv. kontrolní bod dělicího vřeténka – SAC. Pro kontrolní bod G1 je důležitá přítomnost veškerých podmínek potřebných pro syntézu DNA (velikost buňky, prostředí, množství energie a živin). G2 kontrolní bod zajišťuje správnou duplikaci DNA během S-fáze buněčného cyklu a přechod do mitózy (Mantikou *et al.*, 2012). Když jsou kontrolní body oslabeny, je možné, aby buněčný cyklus pokračoval ve fázi M předtím, než jsou chromozomy replikovány nebo než je odstraněno poškození DNA (McCOY *et al.*, 2017). Bylo zjištěno, že v počátečních fázích embryonálního vývoje ještě nefungují klíčové proteiny kontrolních mechanismů. Jedná se hlavně o Rb protein, který je klíčový protein kontrolního bodu G1 buněčného cyklu a Wee1, důležitý protein kontrolního bodu G2. Současně je ale exprimováno mnoho genů, které se podílejí na buněčném dělení, což naznačuje, že počáteční dělení lidských embryí závisí spíše na dělení buněk než na funkčních kontrolních bodech (Mantikou *et al.*, 2012). Funkční SAC, který je přítomen ve stádiu blastocysty, působí jako molekulární ochrana, zastaví mitózu, dokud vada odstraněna. (Kalatova *et al.*, 2015). Embrya, která jsou zastavena v raných vývojových fázích, také vykazují down-regulaci genů, které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu a kontrolních bodů buněčného cyklu jako jsou *CDK1*, *CDK2*, *CHEK2*, *BUB1*, *BUB3*, *BRCA1* a *ART* (McCoy *et al.*, 2017).

Dalším možným vysvětlením, proč SAC nezabraňuje přechodu multipolárních buněk mitózou, je skutečnost, že tento kontrolní bod pro přechod z metafáze do anafáze nekontroluje nadpočetná dělicí vřeténka ani bipolární symetrii vřeténka (Kalatova *et al.*, 2015). SAC je definován jako signalizační síť, která způsobuje prodloužení metafáze a pozdržuje počátek anafáze buněčného cyklu, pokud nejsou kinetochory řádně připojeny k mitotickému vřeténku, je tedy nezbytný pro normální mitotickou progresi (Mantikou *et al.*, 2012; Godinho *et al.*, 2009). Cílem SAC je inhibovat APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*), E3 ubikvitin ligázu. Konkrétně SAC narušuje schopnost Cdc20 aktivovat APC/C. V případě

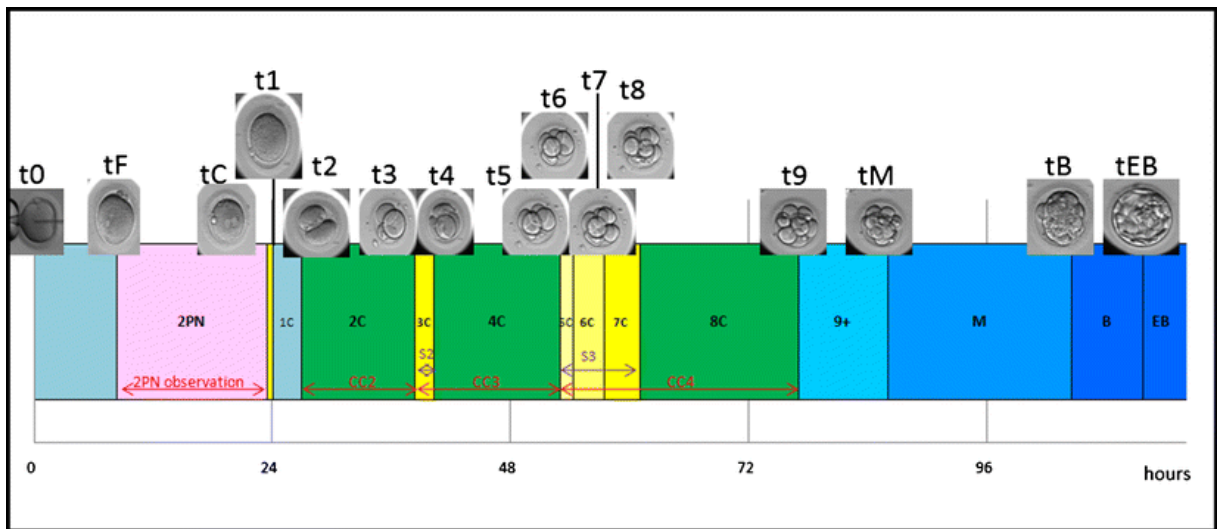
chybného připojení dochází k tomu, že komponenty kontrolního bodu vřeténka-SAC (Bub3, BubR1, Mad1, Mad2, Mps1) jsou zmnoženy a jsou navázány na kinetochory. Tyto proteiny pak následně katalyzují uvolňování inhibitoru, který brání aktivaci komplexu APC/C. Tento inhibitor se nazývá mitotický kontrolní komplex (MCC), což je tetramerický komplex složený ze tří složek SAC (BubR1, Bub3, Mad2) a APC/C koaktivátoru Cdc20 (Lara-Gonzalez *et al.*, 2011). Když jsou všechny kinetochory připojeny, je aktivován komplex APC/C, který katalyzuje ubiquitinaci anafázového inhibitoru sekurinu a cyklinu B1. Jelikož je sekurin inhibitorem separázy, dochází po jeho degradaci k aktivaci separázy. Separáza poté štěpí podjednotku Scc1 v komplexu kohezinu. Tento komplex udržuje vazbu mezi sesterskými chromatidami, takže pokud dojde k destrukci této podjednotky, dochází k oddělení sesterských chromatid. Spekuluje se o tom, zda by právě neúplná degradace separázy v telofázi mitózy nemohla být příčinou toho, proč buňky jsou schopny obcházet kontrolní mechanismy (Kalatova *et al.*, 2015; Lara-Gonzalez *et al.*, 2011; Gondího *et al.*, 2009; Gisselsson *et al.*, 2011).

4 Time-lapse systém

Kritickým bodem IVF je kultivace fertilizovaných oocytů a následný výběr jednoho či více kvalitních embryí pro přenos do dělohy matky. Morfologická klasifikace gamet a embryí je využívána od začátku provádění IVF až po současnost jako nástroj pro hodnocení vývoje embryí. V klasickém IVF je morfologie embrya kontrolována a vyhodnocována v několika diskrétních časových bodech během vývoje embrya. Tím se ale snižuje množství informací, které by mohly být potencionálně získány. Konečné rozhodnutí, kdy se embryo transferuje do dělohy matky, je založeno především na vývojové fázi, počtu buněk, fragmentaci a symetrii blastomer v den přenosu a na morfologickém hodnocení z dřívějších pozorování. Byla prokázána jasná korelace mezi morfologií embrya a jeho schopností se implantovat (Motato *et al.*, 2016; Meseguer *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2012; Kirkegaard *et al.*, 2012). Očekává se, že pozorování embryí umožní lepší pochopení jejich vývoje a také především výběr toho nejkvalitnějšího embrya pro embryotransfer. To především zahrnuje manipulaci a vystavení embryí suboptimálním podmínkám mimo kontrolované prostředí inkubátoru, kdy dochází ke změnám v teplotě, vlhkosti a pH při jejich hodnocení. Cílem je proto omezit zátěž, která je spojena s jejich hodnocením na minimum. Musí být však stanovena určitá rovnováha mezi potřebou hodnocení vývoje embryí a potřebou omezit manipulaci s nimi a tím i vystavení embryí suboptimálním podmínkám (Meseguer *et al.*, 2017).

Time-lapse systém překonává toto omezení bez vystavení embryí změnám kultivačního prostředí. Zavedení hodnocení pomocí time-lapse systému umožňuje kontinuální monitorování vývoje lidských embryí. Umožňuje hodnocení všech morfologických parametrů, které již byly v odpovídajících časových bodech zavedeny do klinické praxe. To zvyšuje kvalitu a množství informací pro posouzení jejich kvality. Time-lapse systém je považován za bezpečný nástroj IVF, protože umožňuje zachovat stabilní kultivační podmínky a zatím nebyly detekovány žádné nežádoucí účinky na embrya. Snímky mohou být podle potřeby získávány v různých časových intervalech během vývoje embryí. Některé studie se domnívají, že díky time-lapse systému mohou být zavedeny nové markery pro výběr nejkvalitnějšího embrya a naopak identifikovány takové markery, které jsou spojeny s minimální pravděpodobností implantace (Kirkegaard *et al.*, 2012; Meseguer *et al.*, 2011; Motato *et al.*, 2016, Kovacs *et al.*, 2014). Time-lapse systém značně zvyšuje počet morfologických pozorování pro posouzení kvality embryí. Použití time-lapse systému umožňuje průběžné sledování vývoje embryí a tím poskytuje komplexní údaje o kinetice jejich vývoje. Umožňuje přesné stanovení počátku, trvání a intervalu mezi buněčným dělením. Kromě toho mohou být kvantifikovány dynamické morfologické charakteristiky vyvíjejícího se lidského embrya, jako je tvorba a vymizení jader, PN, fragmentace, distribuce a velikost blastomer. To vše lze použít k předpovědi implantačního potenciálu daného embrya. Morfokinetické parametry mohou doplnit současné metody výběru embryí, aby případně zvýšily míru úspěšnosti otěhotnění pomocí IVF. Mohou být také použity k předpovědi toho, která embrya se úspěšně vyvinou do stádia blastocysty. Mnoho studií zkoumalo vztah mezi načasováním prvního embryonálního dělení a kvalitou embryí. Předčasné dělení v I. buněčném dělení embrya, které je definováno jako časné dělení v době kontroly 25-27 hodin po ICSI, je jedním z hlavních morfologických faktorů, které se používají pro stanovení kvality embryí (Kaser *et al.*, 2014; Meseguer *et al.*, 2011; Meseguer *et al.*, 2012; Motato *et al.*, 2016). Trvání první cytokineze, interfáze mezi první a druhou mitózou a mezi druhou a třetí mitózou jsou proměnné na základě kterých, lze predikovat, zda se embryo v počátečních fázích vývoje vyvine do stádia blastocysty (Meseguer *et al.*, 2017).

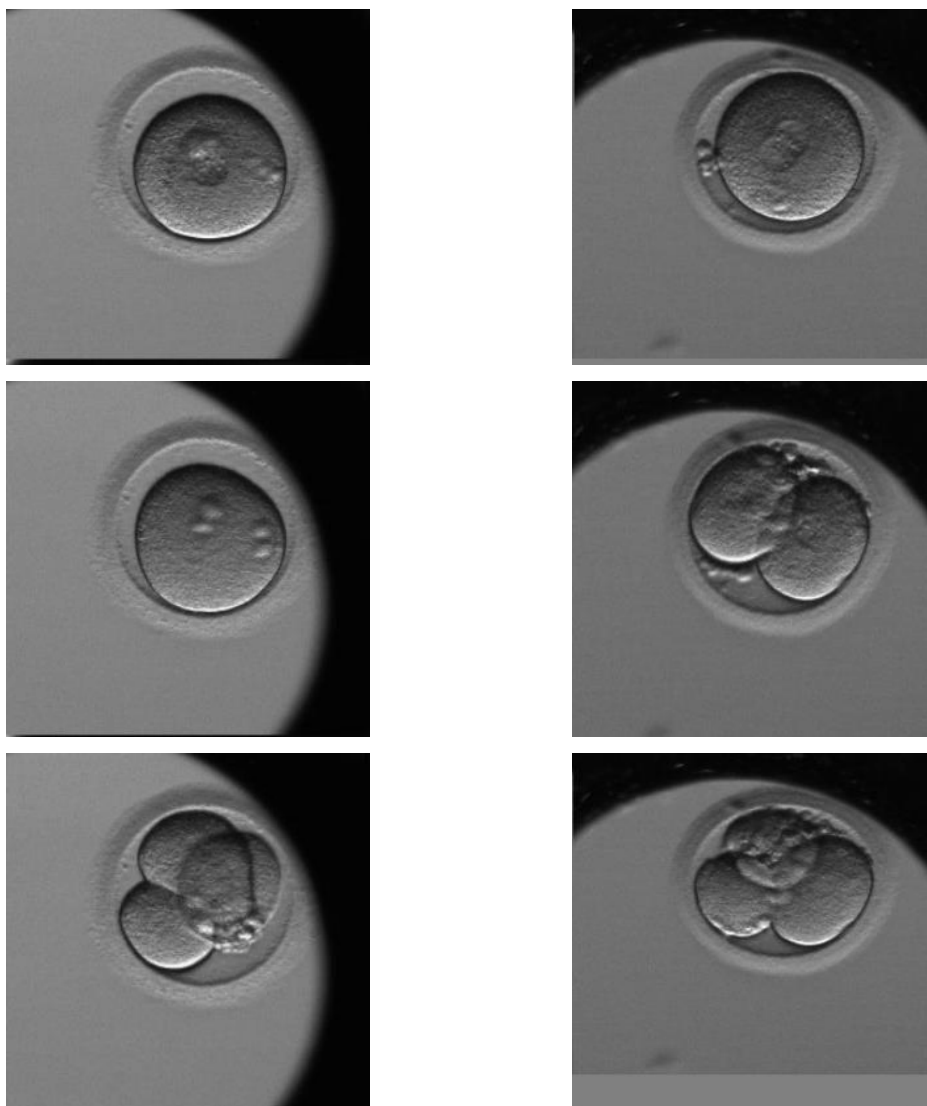
Obrázek č. 15: Schéma ukazuje morfokinetické parametry, které jsou využívány pro hodnocení kvality embryí. To zahrnuje především posouzení doby trvání první cytokineze, dobu mezi první a druhou mitózou a dobu mezi druhou a třetí mitózou.



(Chamayou *et al.*, 2013).

Zavedením této technologie do klinické praxe je možné sledovat vývoj embryí až do dne přenosu. To potencionálně umožňuje přesné zjištění abnormálních morfologických nebo buněčných kinetických událostí vyskytujících se při *in vitro* kultivaci. Abnormality tohoto typu nemohou být snadno detekovány konvenčním pozorováním vzhledem k jejich dynamické povaze a rychlé změně vzhledu jádra a jeho vyblednutí (Lagalla *et al.*, 2017). Pomocí time-lapse systému může být pozorováno množství dynamických dějů, které nastává v krátkém časovém intervalu a obvykle uniknou konvenčnímu pozorování. Lze provádět pozorování všech fází buněčného cyklu, sledování jader před dělením, postupné dělení zygoty, rozlišení velkého fragmentu od blastomery. Jsou také zřetelně odhaleny jiné abnormální události dělení jako je rozdělení zygoty na embryo se třemi buňkami, s největší pravděpodobností spojeno s multipolárním mitotickým dělicím vřetenkem, které zpravidla zůstává bez detekce při použití konvenčního hodnocení kvůli jejich dynamice a formaci, která nastává v době, kdy se neprovádí pozorování (Lagalla *et al.*, 2017).

Obrázky č. 16–21: Zde je na příkladu uvedeno, jaký význam má detekce abnormalit v buněčném dělení embrya pomocí time-lapse systému. Na snímcích vlevo vidíme tripolární mitózu v prvním buněčném dělení. Na snímku vpravo embryo dobré kvality, které bylo vybráno pro transfer. V případě konvenčního pozorování by bylo možné předpokládat, že tyto embrya jsou stejně kvalitní, a chybně přisuzovat tento stav (snímek vlevo) za začátek dalšího dělení jako je tomu ve skutečnosti na snímku vpravo. (fotografie autorky)



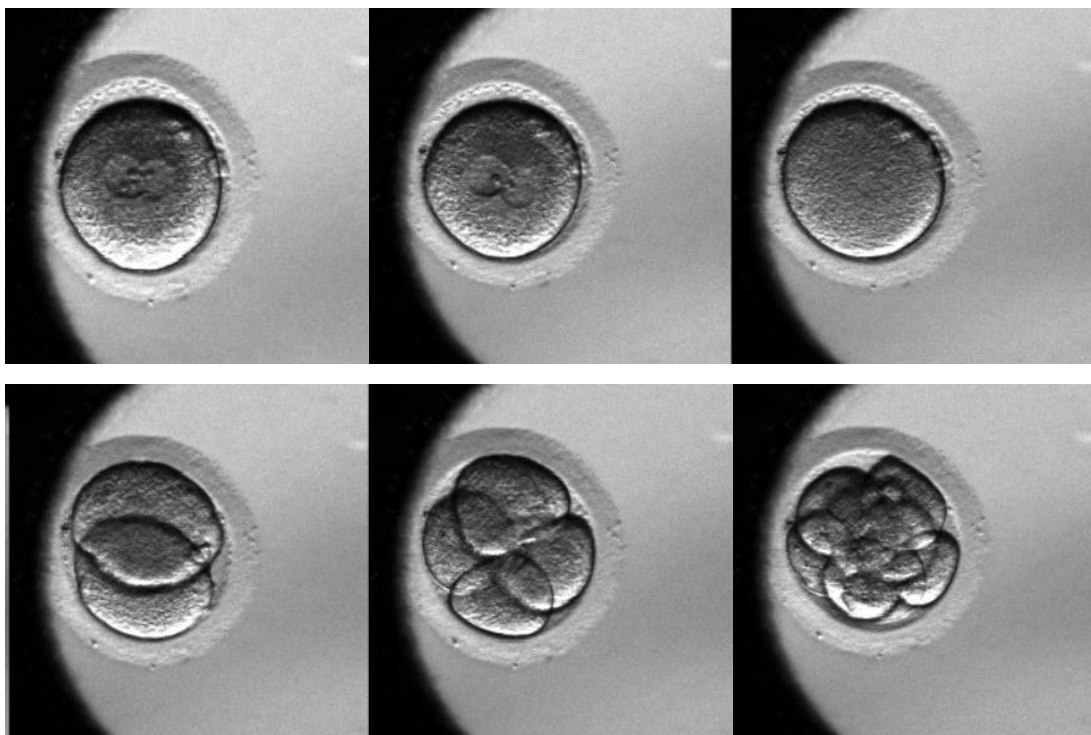
V současné době se používají různé technologie time-lapse systému. Systémy Primo Vision a EmbryoScope využívají technologii jasného pole, zatímco EEVA-Early Embryonic Life Assessment využívá technologii tmavého pole. Všechny tyto systémy obsahují inkorporovaný digitální invertovaný mikroskop, který pořizuje snímky embryí v předem definovaných časových intervalech 5 až 20 minut. Snímky jsou následně zpracovány a poté zobrazovány buď samostatně či jako krátká videa, která lze podrobněji analyzovat. EmbryoScope je inkubátor s integrovaným časovým systémem. V EmbryoScopu jsou embrya

posouvána jedno po druhém do zorného pole integrovaného mikroskopu při každém z akvizic snímku. V tomto systému jsou embrya kultivována ve speciálních kultivačních miskách, což umožňuje sledovat 6 embryí současně, maximálně tedy 72 embryí najednou. Snímky jsou pořizovány v různých časových intervalech v sedmi ohniskových rovinách. Používá se LED osvětlení s nízkou intenzitou (635 nm).

Primo Vision je kompaktní systém digitálního invertovaného mikroskopu, který je navržen tak, aby byl umístěn uvnitř malých či velkých inkubátorů. Embrya jsou v tomto systému kultivována na speciálních kultivačních miskách, obsahující různý počet jamek. Systém může monitorovat až 16 embryí najednou od stejného pacienta. Mikroskop Primo Vision používá jako zdroj světla homogenní zelené LED světlo (550 nm) a je schopen embrya vyhodnotit až v jedenácti ohniskových rovinách. Optický systém je navržen tak, aby bylo zajištěno jak vysoké rozlišení ve velkém zorném poli, tak aby byla zachována co největší bezpečnost embryí. Každá řídicí jednotka je pak schopna sledovat maximálně 96 embryí najednou.

Stejně jako u ostatních systémů vyžaduje EEVA, aby byl do inkubátoru umístěn speciální mikroskop. Tento systém využívá osvětlení tmavého pole pro lepší rozlišení buněčných membrán (Kovacs, 2014).

Obrázky č. 22-27: Snímky pořízené pomocí time-lapse systému, na kterých můžeme vidět normální vývoj preimplantačního embrya.



(Fotografie autorky)

5 Cíle práce

- Detekce tripolární mitózy v prvním a v druhém buněčném dělení embrya pomocí time-lapse systému – Primo Vision v souboru pacientů Prague Fertility Center v období od ledna 2014 do prosince 2014
- Porovnání a statistické zhodnocení získaných dat
 - Zhodnocení věku v celkovém souboru pacientek v závislosti na dárcovství oocytu
 - Zhodnocení výskytu tripolární mitózy v závislosti na věku pacientek
 - Zhodnocení času detekce tripolární mitózy v souboru pacientek, u kterých byla potvrzena
 - Zhodnocení výskytu tripolární mitózy v souvislosti s typem média

6 Materiál a metody

6.1 Pacienti

Celkový soubor zahrnoval 429 pacientek, které podstoupily léčbu neplodnosti v centru asistované reprodukce – Prague Fertility Center v období od ledna 2014 do prosince 2014. Celkový soubor pacientek měl různé indikace k IVF. Nejčastější příčiny byly tubulární sterilita, andrologicky podmíněná neplodnost, sterilita při endometrióze, imunologicky podmíněná sterilita, idiopatická sterilita a dárcovství oocytů. Všechny vzorky pacientek ve věkovém rozmezí 24 až 49 let byly podrobeny morfokinetickému hodnocení embryí pomocí time-lapse systému (Primo Vision) s frekvencí záznamu 1 snímek za 30 minut. Dále byly snímky hodnoceny pro detekci tripolární mitózy v prvním a druhém buněčném dělení embrya. Mezi hlavní kritéria pro embryotransfer patřilo souměrné dělení buněk na sudý počet dceřiných buněk, časné dělení a pokud bylo přistoupeno k prodloužené kultivaci, tak i dosažení stádia blastocysty. Celkový soubor vyšetřovaných embryí od tohoto souboru pacientek činil 3579.

6.2 Hormonální stimulace

Hormonální stimulace žen je jeden z prvních kroků v procesu asistované reprodukce, v cyklu IVF naprosto nezbytným krokem. Vlivem podávání gonadotropních hormonů dochází ke stimulaci vývoje většího množství folikulů současně. Růst těchto antrálních folikulů byl podmíněn injekčně podávaným folikuly stimulujícím hormonem (FSH). FSH je hormon předního laloku hypofýzy, který je nezbytný pro normální průběh folikulogeneze. Dále jsou podávány léky podle určitého typu standardizovaného protokolu v závislosti na tom, zda byl indukován dlouhý stimulační protokol či krátký stimulační protokol. K tomu byla využita aplikace tzv. agonisty nebo antagonisty GnRH, jenž slouží k potlačení ovulace až do dosažení zralosti folikulů. Průběh folikulogeneze byl během hormonální stimulace kontrolován ultrazvukem. Odběr byl naplánován tehdy, kdy bylo dosaženo požadované velikosti folikulů (18 mm). Následné dozrávání folikulů bylo dosaženo aplikací lidského choriového gonadotropinu (hCG), který byl podán přibližně 36 hodin před punkcí. Aspirace folikulární tekutiny byla pak provedena speciální jehlou pod ultrasonografickou kontrolou. Odběr probíhal pod celkovou narkózou pacientky.

6.3 Kultivace

Po odebrání folikulární tekutiny byly pomocí mikroskopu vyhledány oocyty, následně byly přeneseny do fertilizačního media a zbaveny kumulárních buněk, které obklopují každý oocyt. Poté byla zhodnocena jejich kvalita a zralost. Oocyty ve fázi druhého meiotického dělení byly fertilizovány pomocí metody ICSI a vzniklá embrya byla přenesena do kultivačního media. V průběhu kultivace byla umístěna v inkubátoru v konstantním prostředí při teplotě 37°C.

6.3.1 Kultivační media

Continuous Single Culture®	USA
SAGE 1-Step™	Dánsko
Quinn's Advantage™ Sequential Media	Dánsko
EMBRYOGLUE®	Švédsko

IR = Continous Single Culture, Irvine Scientific

SG = Sage One Step od Origio, As CooperGenomicsSM

QC = Quinn's Advantage Sequential Medium for Cleavage Stage embryos, As CooperGenomicsSM

EG = Embryoglue, Vitrolife

6.4 Hodnocení embrya

6.4.1 Time-lapse systém – Primo Vision

Primo Vision (Vitrolife, Göteborg, Švédsko) se sestává z kompaktního digitálního inverzního mikroskopu s kamerou, který je umístěn uvnitř uzavřeného inkubátoru, a také z řídicí počítačové jednotky. Kamera podle předem zadaných parametrů pořizuje záznam, který je přenášen na monitor počítače. Pro toto sledování byla embrya umístěna na specifických kultivačních miskách v mediu pod olejem v devíti či šestnácti samostatných jamkách, ve kterých byla všechna embrya od jedné pacientky umístěna. Analýza všech informací získaných ohledně morfologie a kinetiky vývoje embryí byla prováděna ze snímků pomocí speciálních softwarů.

Obrázek č. 28: Time-lapse Primo Vision.



(Vitrolife)

Obrázek č. 29: Kultivační miska



(Vitrolife)

6.5 Výběr embrya pro embryotransfer

Morfologické parametry jsou významnými prognostickými faktory, které poskytují informace o stavu a kvalitě příslušného embrya. Existuje velké množství kritérií, která se uplatňují při výběru daného embrya/embryí pro transfer do dělohy matky. Tato kritéria jsou doporučena Evropským společenstvím pro lidskou reprodukci – ESHRE. Hlavním bod pro posouzení kvalitních a životaschopných embryí byl dán kontrolou počtu a kvality jednotlivých

buněk v embryu, které hodnotil embryolog. Především bylo posuzováno souměrné dělení buněk na sudý počet dceřiných buněk, časné dělení a při prodloužené kultivaci pak dosažení stádia blastocysty. Většina embryí v tomto souboru byla kultivována do třetího dne. Hodnocena byla celá škála znaků jako například množství fragmentů, které se nacházely mezi sesterskými buňkami, vzniklých při asymetrickém odštěpení cytoplazmy buněk, a které snižovaly implantační potenciál daných embryí. Pozorovány byly různé anomálie dělení buněk během časného dělení embryí například asymetrické dělení, fragmentace buněk či fúze buněk, které snižují kvalitu embrya. Kontinuálním monitorováním vývoje embryí (Primo Vision) byl pozorován vznik těchto abnormalit a byla vybrána pouze ta embrya, která vykazovala optimální kvalitu. Při kontinuálním snímání embryí bylo možné přesně určit délku časových intervalů dělení buněk. Intervaly dělení buněk embryí byly pak ze získané analýzy zpracovány a porovnány s referenčními hodnotami a následně použity k vyhodnocení nejkvalitnějšího embrya pro implantaci.

6.6 Embryotransfer

Embryotransfer je ambulantní výkon, při kterém je embryo zavedeno pomocí katétru do sliznice dutiny děložní, vše je prováděno pod ultrasonografickou kontrolou. Příprava endometria spočívá nejčastěji v perorálním užití estrogenní substituční léčby. V průběhu zákroku je velice nutné se vyhnout poranění endometria a následnému krvácení do dutiny děložní. Po provedení výkonu, který trvá přibližně dvě hodiny je pacientka krátce monitorována na lůžku a zanedlouho odchází domů.

6.7 Metody statistického zpracování dat

Celkový soubor pacientek byl pro zpracování statistických dat zaznamenán v programu Microsoft Excel. Získaná data byla následně vyhodnocena příslušným statistickým testem. Hladina významnosti byla stanovena (p -hodnota $<0,05$). V tabulce bylo zaznamenáno jméno pacientky a její věk. Dále bylo uvedeno medium, ve kterém byla příslušná embrya získaná od pacientky kultivována. Také byla uvedena informace, zda bylo podstoupeno dárcovství oocyty či spermie následně čas fertilizace a čas začátku detekce time-lapse systému, přítomnost detekované tripolární mitózy v prvním a druhém buněčném dělení embrya a zaznamenaný čas (od fertilizace po detekci tripolární mitózy), počet oocytů získaných po hormonální stimulaci a

počet oplodněných oocytů, dále počet celkového souboru embryí, která byla vybrána pro transfer do dělohy matky a počet embryí, která byla pro případné další cykly IVF kryokonzervována.

7 Výsledky

7.1 Time-lapse systém – Primo Vision

Celkem bylo vyšetřeno pomocí time-lapse systému a morfologicky vyhodnoceno 3579 embryí. V tomto celkovém souboru byla pozitivně identifikována tripolární mitóza v 95 případech u 69 pacientek. Celkové zastoupení tripolární mitózy v souboru embryí činilo 2,65 % a zastoupení v souboru pacientek činilo 16,08 %. Nejmladší pacientce bylo 22 let, naopak nejstarší pacientce 49 let. Průměrný věk pacientek z celkového souboru je 37,56 let, s mediánem 42,5 let a modem 37 let. Všechny pacientky, u kterých byla identifikována tripolární mitóza, jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 Přehled všech pacientek, u kterých byla identifikována tripolární mitóza v prvním a v druhém buněčném dělení embrya. V tabulce je uvedeno číslo pacientky a v některých případech písmeno, které označuje počet embryí od dané pacientky, věk pacientky, pokud bylo přistoupeno k dárcovství oocytu/spermie; MED – médium ve kterém byla embrya kultivována; přesný čas fertilizace; čas detekce tripolární mitózy v prvním buněčném dělení embrya; čas od fertilizace k detekci tripolární mitózy v I. a II. buněčném dělení embrya (hodiny); detekce II. – detekce tripolární mitózy v II. buněčném dělení embrya.

PAC	VĚK	DÁRCE	MED	FERTILIZACE	DETEKCE I.	ČAS	DETEKCE II.
1	33		SG	26.11.2014 13:30	28.11.2014 1:58	36,47	
2.A	32		EG	05.03.2014 12:45	07.03.2014 13:04	48,32	
2.B	32		EG	05.03.2014 12:45	06.03.2014 23:34	34,82	
3	30	Spermie	SG	20.08.2014 13:40	21.08.2014 16:56	27,27	
4	37	Spermie	QC	29.03.2014 12:37	30.03.2014 23:09	34,53	
5	32		IR	12.02.2014 13:00	14.02.2014 17:24	52,4	
6	41		IR	28.01.2014 13:30	30.01.2014 3:59	38,48	
7	37	Spermie	QC	12.06.2014 13:10	13.06.2014 13:29	24,32	
8.A	38		QC	02.04.2014 12:40	03.04.2014 16:58	28,3	
8.B	38		QC	02.04.2014 12:40	03.04.2014 23:28	34,8	
9	30		QC	14.04.2014 14:40	15.04.2014 16:57	26,28	
10.A	33		IR	21.02.2014 12:45	22.02.2014 18:28	29,72	
10.B	33		IR	21.02.2014 12:45	22.02.2014 16:28	27,72	
10.C	33		IR	21.02.2014 12:45	22.02.2014 22:58	34,22	
11	35		SG	29.10.2014 14:00	30.10.2014 23:17	33,28	

12.A	43	Oocyt	SG	02.10.2014 12:27	03.10.2014 21:29	33,03	
12.B	43	Oocyt	SG	02.10.2014 12:27	03.10.2014 10:59	22,53	
13	36		QC	15.03.2014 13:00	16.03.2014 20:18	31,3	
14	38		QC	31.05.2014 10:54	02.06.2014 0:02	37,13	
15	39		SG	06.12.2014 11:24	07.12.2014 12:01	24,62	
16	36	Spermie	IR	26.08.2014 13:55	28.08.2014 0:14	34,32	
17	39	Oocyt	SG	11.12.2014 13:35	12.12.2014 10:15	20,67	
18A	30		SG	08.09.2014 12:30	09.09.2014 18:36	30,1	
18B	30		SG	08.09.2014 12:30	09.09.2014 23:36	35,1	
19	46	Oocyt	IR	15.01.2014 12:00	16.01.2014 16:51	28,85	
20	46	Oocyt	SG	13.05.2014 13:00	14.05.2014 21:48	32,8	
21A	49	Oocyt	SG	20.08.2014 14:10	21.08.2014 21:23	31,22	
21B	49	Oocyt	SG	20.08.2014 14:10	21.08.2014 20:23	30,22	
21C	49	Oocyt	SG	20.08.2014 14:10	21.08.2014 19:53	29,72	
22	34		SG	22.09.2014 14:41	23.09.2014 16:42	26,02	
23	41		SG	06.11.2014 14:25	07.11.2014 19:41	29,27	
24	34		IR	05.02.2014 14:18	07.02.2014 4:50	38,53	
25	43	Oocyt	SG	15.10.2014 13:50	16.10.2014 19:01	29,18	
26	33		SG	10.10.2014 12:30	11.10.2014 20:15	31,75	
27	37		SG	10.09.2014 13:45	11.09.2014 15:36	25,85	
28	38		SG	19.11.2014 13:45	20.11.2014 22:50	33,08	
29	37		SG	03.11.2014 13:15	04.11.2014 22:12	32,95	
30A	36		SG	01.12.2014 14:10	02.12.2014 14:45	24,58	
30B	36		SG	01.12.2014 14:10	02.12.2014 19:45	29,58	
31A	32		IR	29.01.2014 13:30	31.01.2014 12:37	47,12	
31B	32		IR	29.01.2014 13:30	31.01.2014 18:37	53,12	
32	42		SG	14.10.2014 12:20	15.10.2014 19:14	30,9	
33	41		QC	02.05.2014 15:10	03.05.2014 20:47	29,62	
34	41		SG	01.11.2014 12:20	02.11.2014 11:04	22,73	
35	27		SG	17.09.2014 14:00	18.09.2014 16:55	26,92	
36	34	Oocyt	SG	16.09.2014 13:10	17.09.2014 18:17	29,12	
37	35		IR	28.01.2014 14:00		28,06	29.01.2014 18:04
38	37		OR	24.07.2014 13:50		50,81	26.07.2014 16:39
39	34		IR	11.02.2014 13:00	13.02.2014 2:48	37,8	
40A	36		SG	01.11.2014 12:40	02.11.2014 17:02	28,37	
40B	36		SG	01.11.2014 12:40	02.11.2014 17:32	28,87	
40C	36		SG	01.11.2014 12:40	02.11.2014 18:02	29,37	
41	32		IR	19.02.2014 14:32	20.02.2014 20:03	29,52	
42	47	Oocyt	OR	16.07.2014 13:20	17.07.2014 20:36	31,27	
43	44	Oocyt	SG	12.08.2014 13:00	13.08.2014 12:17	23,28	
44	36	Oocyt	SG	15.10.2014 14:00		30,63	16.10.2014 20:38
45A	31		SG	18.08.2014 13:40	19.08.2014 16:43	27,05	
45B	31		SG	18.08.2014 13:40	19.08.2014 18:43	29,05	

46A	34		IR	17.01.2014 11:56	18.01.2014 21:38	33,7	
46B	34		IR	17.01.2014 11:56	18.01.2014 20:38	32,7	
47	41		QC	04.04.2014 13:20	05.04.2014 17:02	27,7	
48A	30		QC	02.06.2014 14:00	03.06.2014 16:21	26,35	
48B	30		QC	02.06.2014 14:00	03.06.2014 15:21	25,35	
49	26	Spermie	QC	13.03.2014 15:00	14.03.2014 15:30	24,5	
50A	44	Oocyt	QC	04.06.2014 12:01	06.06.2014 18:03	54,03	
50B	44	Oocyt	QC	04.06.2014 12:01	06.06.2014 1:03	37,03	
51A	33	Oocyt	SG	11.08.2014 14:45	12.08.2014 18:36	27,85	
51B	33	Oocyt	SG	11.08.2014 14:45	13.08.2014 0:09	33,4	
52	33		SG	14.10.2014 13:30	15.10.2014 18:36	29,1	
53	37		SG	22.09.2014 13:00	23.09.2014 15:40	26,67	
54	34		SG	08.12.2014 14:00	09.12.2014 19:47	29,78	
55A	36		QC	16.05.2014 11:40	17.05.2014 14:17	26,62	
55B	36		QC	16.05.2014 11:40	17.05.2014 16:02	28,37	
55C	36		QC	16.05.2014 11:40	17.05.2014 16:47	29,12	
55D	36		QC	16.05.2014 11:40	17.05.2014 16:32	28,87	
55E	36		QC	16.05.2014 11:40	17.05.2014 15:47	28,12	
56		Spermie	SG	03.10.2014 15:45	04.10.2014 22:41	30,93	
57	34		IR	30.08.2014 12:20	31.08.2014 11:13	22,88	
58	46	Oocyt	IR	11.02.2014 13:45	12.02.2014 19:28	29,72	
59	47	Oocyt	SG	14.12.2014 13:00	15.12.2014 17:01	28,02	
60	43	Oocyt	IR	05.02.2014 13:50	06.02.2014 13:52	24,03	
61A	32		QC	02.05.2014 15:00	03.05.2014 20:22	29,37	
61B	32		QC	02.05.2014 15:00	03.05.2014 22:22	31,37	
62	39	Oocyt	QC	14.05.2014 14:40	15.05.2014 20:43	30,05	
63	44	Spermie	SG	02.12.2014 12:00	04.12.2014 3:46	39,77	
64A	31		SG	11.11.2014 13:15	12.11.2014 14:38	25,38	
64B	31		SG	11.11.2014 13:15	12.11.2014 15:08	25,88	
64C	31		SG	11.11.2014 13:15	12.11.2014 19:38	30,38	
64D	31		SG	11.11.2014 13:15	13.11.2014 1:38	36,38	
65	37		QC	08.03.2014 14:32	09.03.2014 14:33	24,02	
66	34		IR	27.02.2014 14:00	28.02.2014 22:41	32,68	
67	38		IR	21.02.2014 12:25	22.02.2014 11:30	23,08	
68	35	Oocyt	SG	05.11.2014 13:21	06.11.2014 12:06	22,75	
69	37		QC	14.05.2014 14:10	15.05.2014 16:24	26,23	

7.2 Analýza dat

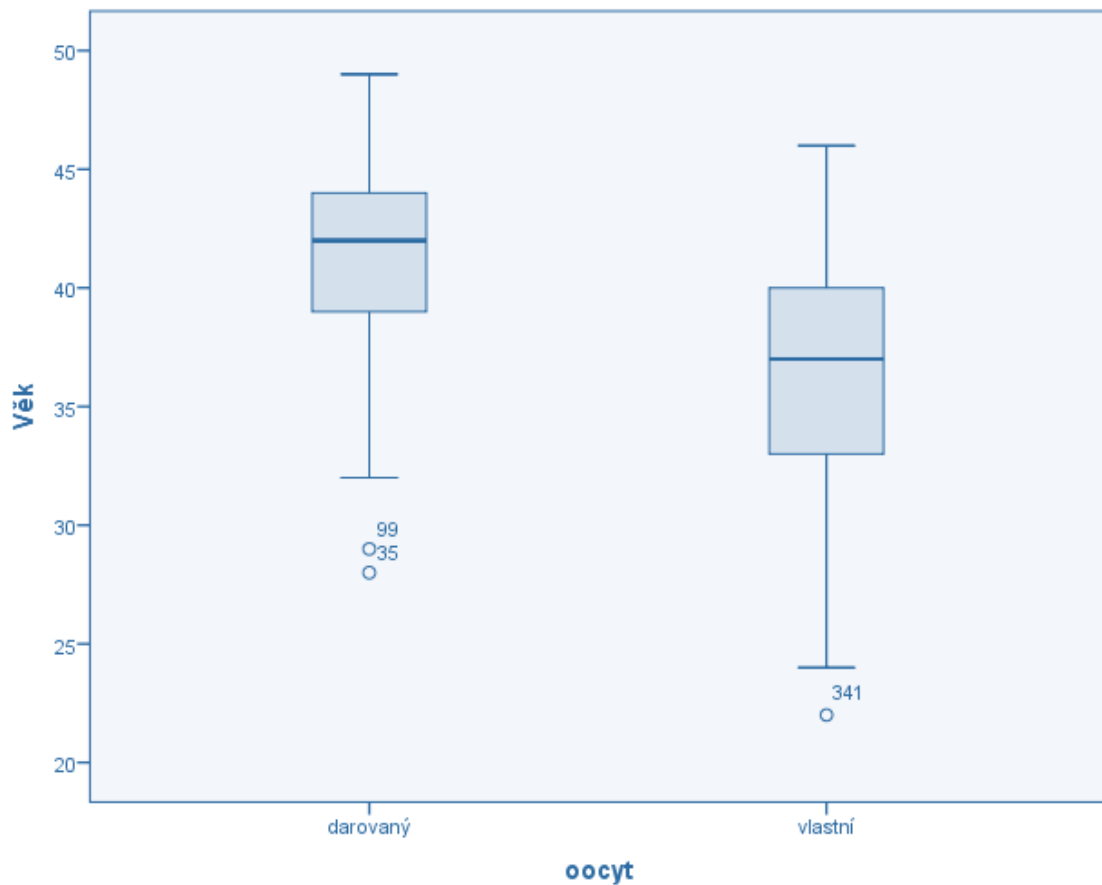
7.2.1 Hodnocení pacientek v závislosti na využití vlastního či darovaného oocyty a věku

Celkový soubor pacientek byl rozdělen na dvě skupiny podle toho, zda byly použity jejich vlastní oocyty - 325 (75,76 %) pacientek, nebo zda bylo přistoupeno k darování oocytů - 105 (24,48 %) pacientek. Průměrný věk pacientek, u kterých byly použity jejich vlastní oocyty činil 36,29 let a průměrný věk pacientek s darovanými oocyty činil 41,43 let. U 8 pacientek tato informace nebyla uvedena, proto z tohoto souboru musely být pro tuto analýzu vyloučeny. Po korekci skupina pacientek s darovanými oocyty zahrnovala 104 (24,24 %) pacientek, soubor pacientek s vlastními oocyty pak obsahoval 318 (74,13 %) pacientek. Celkový soubor se tedy zúžil na 422 pacientek. Popsáno v tabulce č. 2., rozdělení pacientek dle věku a dárcovství oocyty pak v grafu č.1.

Tabulka č. 2 V tabulce je uveden průměrný věk pacientek s darovaným, či vlastním oocytem, počet pacientů v souboru, medián a směrodatná odchylka.

Oocyt	Průměr	Medián	N	Směr. odchylka
Darovaný	41,43	42	104	4,16
Vlastní	36,29	37	318	4,66
Celkem	37,56	38	422	5,05

Graf č. 1 Rozdělení pacientek dle věku a použitého oocytu. Čísla u ° extrémních hodnot odkazují na čísla řádků pacientek v celkovém souboru v excelu, který byl pro statické hodnocení dat vytvořen.



Pomocí Shapiro-Wilkova testu bylo zjištěno, že věk žen s vlastním oocytem (p -hodnota 0,004) i s darovaným oocytem (0,004) nemá normální rozložení dat. Není tedy možné použít k porovnání dvouvýběrový t -test, ale je nutné použít neparametrický test, Mann-Whitney U test. Pomocí tohoto testu bylo zjištěno, že distribuce obou rozdělení není shodná (p -hodnota 0,000). Znamená to tedy, že nepřijímáme H_0 . Můžeme tedy říci, že ženy s darovaným oocytem jsou statisticky o 5,14 let starší než ženy s oocytem vlastním. Celkový soubor žen s darovaným oocytem čítal jen 3x méně pacientek, než tomu bylo u pacientek s vlastním oocytem. Tento výsledek odpovídá předpokladu, že dárcovství oocytů bude nutné provádět ve větší míře spíše u pacientek ve vyšším věku než u pacientek mladších.

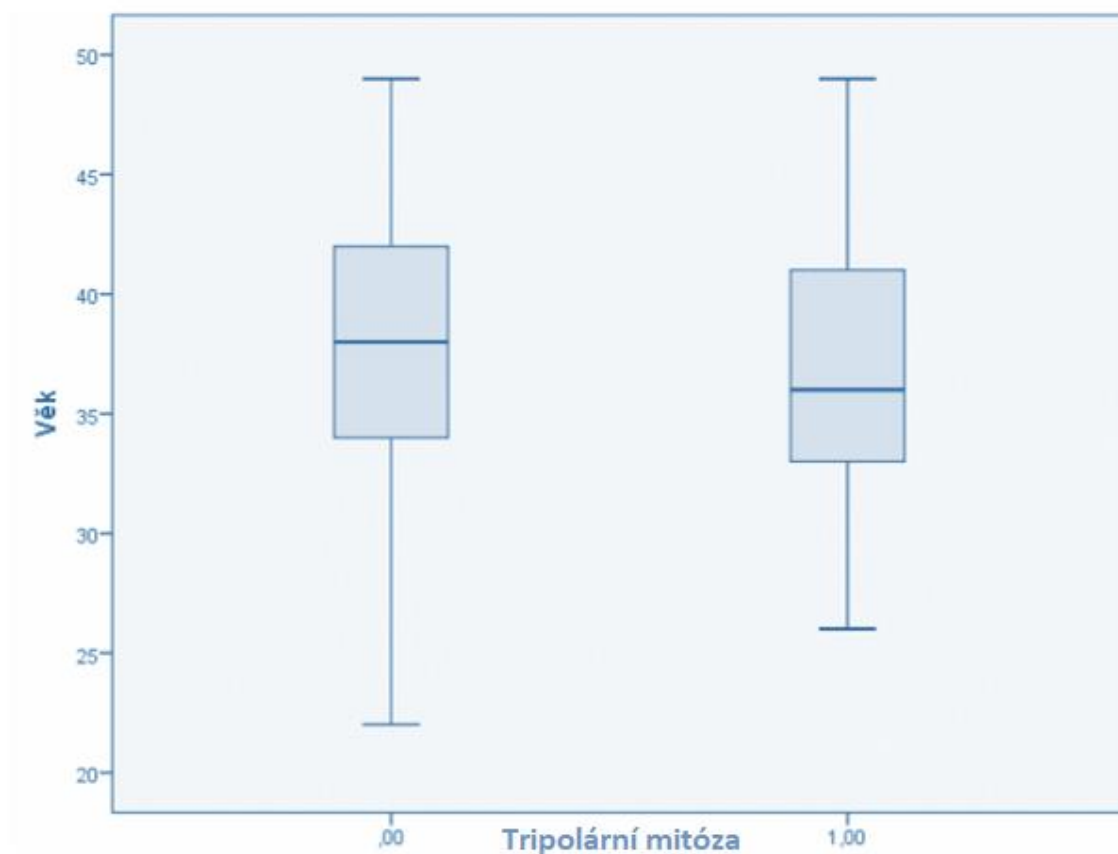
7.2.2 Hodnocení dle věku a vzniku tripolární mitózy

Jak vyplývá z tabulky č. 1 byla tripolární mitóza detekována z celkového souboru 3579 embryí od 429 pacientek u 69 (16,08 %) pacientek. Průměrný věk těchto pacientek činil 36,79 let. Jelikož u jedné pacientky nebylo uvedeno datum narození nebyla do tohoto souboru zařazena. U 360 (83,92 %) pacientek nebyla pozorována tripolární mitóza. Průměrný věk těchto pacientek byl 37,37 let, který byl vypočten ze souboru 354 (82,52 %) pacientek, u kterých byl zjištěn věk. Průměrný věk všech pacientek v souboru je 37,56 let. Takto byl celkový soubor pacientek rozdělen do dvou skupin. Vše je uvedeno v tabulce č. 3. Rozdělení žen dle věku a vzniku tripolární mitózy je patrné z grafu č. 2.

Tabulka č. 3 Zde je uveden průměrný věk pacientek, u kterých byla/nebyla detekována tripolární mitóza, jejich počet a směrodatná odchylka.

Tripolární mitóza	Průměr	Medián	N	Směr. odchylka
Ne	37,70	38	354	5,00
Ano	36,79	37	68	5,27
Celkem	37,56	38	422	5,05

Graf č. 2 Hodnocení věku v souvislosti se vznikem tripolární mitózy u pacientek u kterých (1) byla/nebyla (0) detekována tripolární mitóza.



Nejprve byl proveden Shapiro-Wilkův test, aby bylo zjištěno, zda mají skupiny normální rozložení. Z výsledku testu vyplývá, že skupina pacientek, jejichž embrya nevykazovala tripolární mitózu v prvním a v druhém buněčném dělení embrya, nemá normální rozložení (0,000) a skupina pacientek, u nichž byla zaznamenána tripolární mitóza v souboru embryí, má normální rozložení (0,198). Protože jedna skupina nemá normální rozložení dat, bylo nutné použít neparametrický test, Mann-Whitney U test.

Tabulka č. 4 Výsledky statistické analýzy získaných dat

	Tripolární mitóza	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Stup. volnosti	p-hodnota	Statistic	Stup.volnosti	p-hodnota
Věk	Ne (0)	0,074	354	0	0,983	354	0
	Ano (1)	0,114	68	0,03	0,975	68	0,198

Pomocí Mann-Whitney U testu nebylo zjištěno, že existuje statisticky významný rozdíl ve věku pacientek v závislosti na výskytu tripolární mitózy (p-hodnota 0,089). Z toho vyplývá, že pacientky, u kterých byla detekována tripolární mitóza jsou přibližně stejně staré jako pacientky, u kterých tripolární mitóza nebyla detekována.

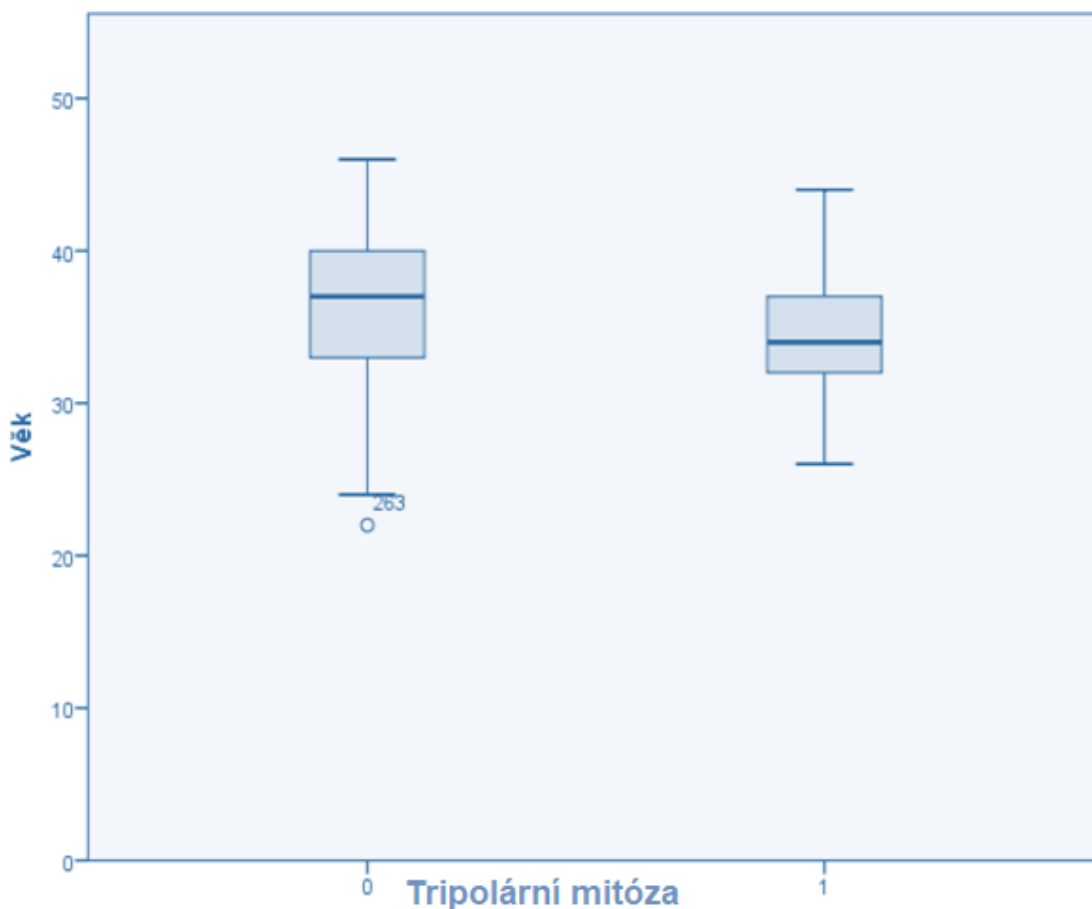
7.2.3 Hodnocení pacientek s vlastním oocytem dle věku a vzniku tripolární mitózy

Zde jsme se zaměřili na soubor pacientek, u kterých nebylo indikováno dárcovství oocytu. To znamená, že pacientky s darovaným oocytem jsou z tohoto souboru vyřazeny. V tomto souboru bylo 324 pacientek s vlastním oocytem. U šesti pacientek informace o věku chyběly a musely být z analýzy vyloučeny. Celkový soubor pacientek tedy činil 318. Tento soubor byl dále rozdělen na dvě skupiny dle přítomnosti tripolární mitózy. U 51 (16,04 %) pacientek byla detekována tripolární mitóza a u 267 (83,96 %) pacientek nebyla přítomnost tripolární mitózy potvrzena. Viz tabulka č. 5 a v grafu č.3.

Tabulka č. 5 Zde je uveden průměrný věk pacientek, u kterých byla/nebyla detekována tripolární mitóza, jejich počet a směrodatná odchylka.

Tripolární mitóza	Průměr	Medián	N	Směr. Odchylka
Ne (0)	36,54	37	267	4,73
Ano (1)	34,98	34	51	4,05
Total	36,29	37	318	4,66

Graf č. 3: Znázornění rozdělení pacientek dle věku a vzniku tripolární mitózy u pacientek u kterých (1) byla/nebyla (0) detekována tripolární mitóza. ° odlehlá hodnota, odkazující na celkový soubor v Excelu.



Byl proveden Shapiro-Wilkův test, aby bylo zjištěno, zda mají skupiny normální rozdělení. Z výsledku testu vyplývá, že skupina pacientek, u kterých byla detekována tripolární mitóza, nemá normální rozložení (0,003) a skupina pacientek, u kterých nebyla detekována tripolární mitóza, má normální rozdělení (0,558). Protože jedna skupina nemá normální rozdělení, bude opět použit neparametrický test, Mann-Whitney U test.

Tabulka č. 6 Výsledky statistické analýzy získaných dat.

	Tripolární mitóza	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Stup. volnosti	p-hodnota	Statistic	Stup. volnosti	p-hodnota
Věk	Ne (0)	0,071	267	0,003	0,983	267	0,003
	Ano (1)	0,105	51	,200*	0,98	51	0,558

Z výsledku Mann-Whitney U testu vyplývá, že zamítáme H0. Přijímáme hypotézu H1. To znamená, že věk na tripolární mitózu (p-hodnota 0,016) má vliv. Lze říci, že pacientky, u kterých byla detekována tripolární mitóza, jsou zanedbatelně mladší než pacientky, u kterých nebyla tripolární mitóza detekována. Průměrný věk patientek, u kterých byla detekována tripolární mitóza, činil 34,98 let. U patientek, u kterých nebyla detekována tripolární mitóza, činil průměrný věk 36,54 let.

7.2.4 Hodnocení vzniku tripolární mitózy podle typu kultivačního media

Zde je uvedena kontingenční tabulka č. 7, která popisuje výskyt tripolární mitózy u jednotlivých patientek v závislosti na typu konkrétního média, které bylo použito ke kultivaci embryí. Z tabulky č. 8 je uvedena frekvence výskytu tripolární mitózy v souvislosti s použitým typem media.

Tabulka č. 7 Zde je uveden výskyt tripolární mitózy v různých typech media.

		Tripolární mitóza		Celkem
		Ne	Ano	
Médium	neuvedeno	5	0	5
	EG	4	1	5
	IR	81	15	96
	OR	26	1	27
	QC	102	16	118
	QR	1	0	1
	SG	141	36	177
Celkem pacientů		360	69	429

Tabulka č. 8 Frekvence výskytu tripolární mitózy v různých mediích.

Médium	Tripolární mitóza
neuvedeno	0,00%
EG	20,00%
IR	15,63%
OR	3,70%
QC	13,56%
QR	0,00%
SG	20,34%
Celkem	16,08%

Největší frekvence výskytu tripolární mitózy byla zaznamenána v mediu SG (20,34 %) a v EG (20,00 %). Dále v mediu IR byl výskyt tripolární mitózy (15,63 %); v QC (13,53 %); OR (3,70 %). Celkové zastoupení tripolární mitózy v souboru pacientek činilo 16,08 %. Je zde nutné vzít v úvahu, že rozdělení dat – hlavně pak četností využití jednotlivých kultivačních medií je velmi nerovnoměrné a je s velkou pravděpodobností zdrojem systematické chyby. Pro spolehlivější porovnání bychom potřebovali rovnoměrné rozložení dat.

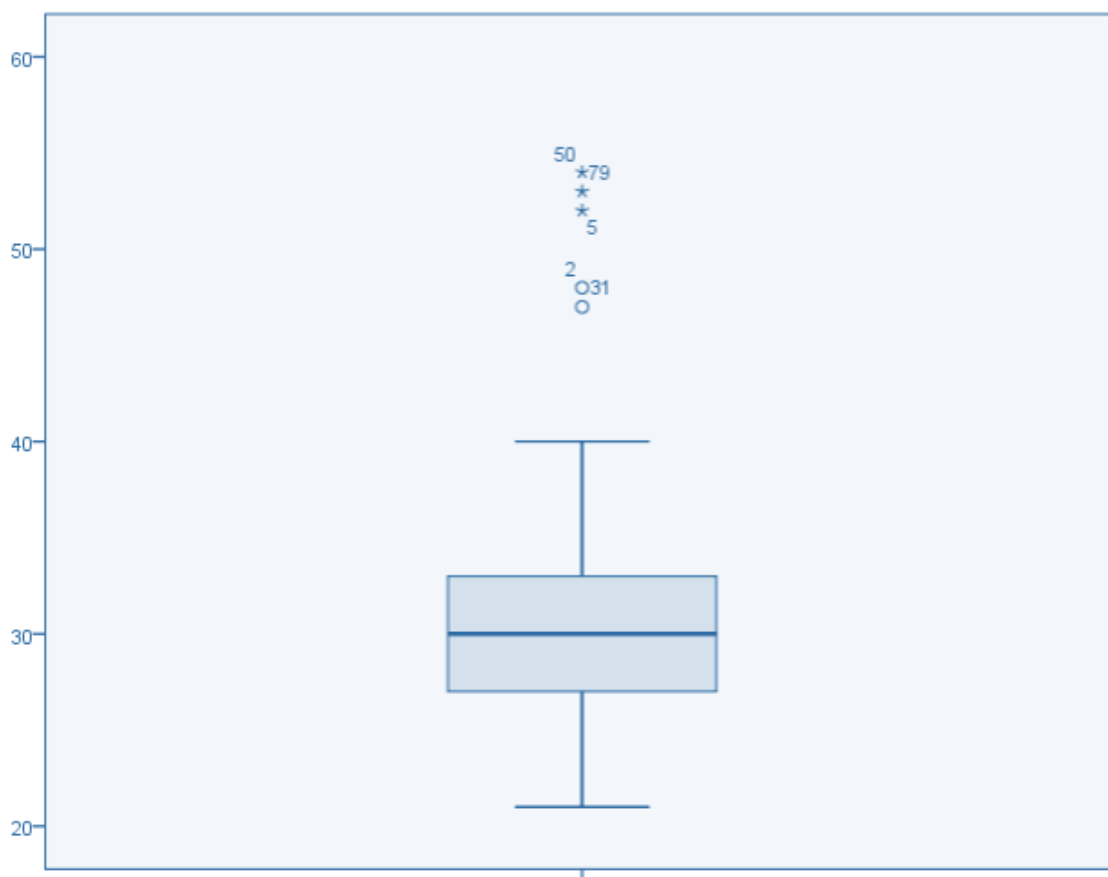
7.2.5 Čas detekce tripolární mitózy

Pomocí time-lapse systému byla identifikována tripolární mitóza u 95 embryí. Soubor dat byl omezen na 92 embryí, jelikož u 3 z nich byla identifikována tripolární mitóza během druhého buněčného dělení embrya. Rozdělení doby od fertilizace po detekci tripolární mitózy zachycuje následující tabulka a graf. Průměrná doba, kdy byla detekována tripolární mitóza, byla 30,76 hodin a mediánová 30,00. S 95 % hladinou pravděpodobnosti byla doba, kdy můžeme detekovat tripolární mitózu mezi 29,43 a 32,08 hodinami. Nejkratší doba detekce byla 21 hodin a nejdelší 54 hodin. V tomto souboru pacientek bylo v průměru každé pacientce odebráno 8,28 oocytů, které byly následně fertilizovány, z nichž v průměru 1,34 embryí vykazovalo tripolární mitózu v I. buněčném dělení, což je uvedeno v následující tabulce č. 9 a v grafu č. 4.

Tabulka č. 9 Statistické zpracování času detekce tripolární mitózy

		Statistic	Std. Error	
ČAS	Průměr	30,76	0,668	
	95% interval spolehlivosti pro průměr	Dolní hranice	29,43	
		Horní hranice	32,08	
	Medián	30		
	Rozptyl	40,563		
	Směrodatná odchylka	6,369		
	Minimum	21		
	Maximum	54		
Rozpětí	33			

Graf č.4: Tento graf znázorňuje čas detekce tripolární mitózy, * extrémní hodnota, ° odlehlé hodnoty odkazující na celkový soubor pacientů, který byl vytvořen v excelu pro tuto analýzu.



8 Diskuze

V současné době mnoho center asistované reprodukce využívá time-lapse systém ke kontinuálnímu monitorování embryí bez toho, aniž by byly narušeny jejich kultivační podmínky. Bylo navrženo několik parametrů k posouzení časného vývoje embryí. Tyto parametry by měly předpovědět vývoj embryí až do stádia blastocytu. Time-lapse systém proto může snížit potřebu prodloužené kultivace až do stádia blastocysty v případě správně zvolených parametrů během časného vývoje embryí (Meseguer *et al.*, 2011, Cruz *et al.*, 2012). Použití time-lapse systému v klinické praxi zvyšuje také míru těhotenství o 10 % v porovnání s konvenčním hodnocením embryí. To potvrzuje Rubio *et al.*, 2014 v randomizované studii, ve byla vybrána skupina pacientů, jejichž embrya byla kultivována ve standardních inkubátorech a hodnocena pouze pomocí obvyklých morfologických kritérii. U druhé skupiny pacientů byla embrya kultivována v inkubátoru a jejich morfologie byla hodnocena pomocí time-lapse systému, tím mohly porovnat výsledky z obou skupin a ověřit očekávané zlepšení v míře úspěšného otěhotnění ve skupině pacientek, u kterých byl pro morfologické hodnocení embryí použit time-lapse systém.

8.1 Tripolární mitóza

Tripolární mitóza je děj, ve kterém můžeme pozorovat vznik více než dvou dceřiných blastomer v průběhu buněčného dělení embrya. Od zavedení time-lapse systému do klinické praxe je tento děj předmětem rozsáhlých výzkumů (McCoy *et al.*, 2017; Wirka *et al.*, 2014). Bylo prokázáno, že výskyt tripolární mitózy koreluje se špatným vývojovým a implantačním potenciálem embryí (Rubio *et al.*, 2012; Chamayou *et al.*, 2013; Meseguer *et al.*, 2012). Původně byl vznik tripolární mitózy pozorován a dáván do souvislosti u zygot, které vznikly fertilizací oocyty se dvěma spermii. Bylo publikováno, že většina oocytů 3PN se souběžně dělila přímo na tři blastomery v prvním buněčném dělení embrya. Každá ze dvou spermií při fertilizaci oocyty předá svoji centriolu, jejíž duplikací vzniká centrozom. V tomto případě vlivem abnormálního počtu centrozomů vzniká multipolární vřetenko. Taková embrya pak ve výsledku mohou být triploidní, diploidní či jinak defektní (Kola *et al.*, 1987; Rubio *et al.*, 2012). To je však vyloučeno v centrech asistované reprodukce, pokud je použita metoda ICSI, kdy pomocí této mikromanipulační metody je vpravena do cytoplazmy oocyty pouze jediná spermie. Pokud jsou taková embrya detekována, jsou následně vyřazena z celkového souboru embryí dané pacientky. Tato diplomová práce zahrnuje pouze embrya, u kterých byla potvrzena

přítomnost tripolární mitózy v 2PN zygotě po fertilizaci, proto vyřazení 3PN zygot ze souboru embryí není dostatečné k vyloučení přítomnosti tripolární mitózy (Kalatova *et al.*, 2015). Jak předpokládá jedna z publikací (Rubio *et al.*, 2012), může být kvalita spermatu jedním z faktorů, který může ovlivnit tvorbu abnormálního mitotického vřeténka, což může způsobovat abnormality během časného dělení embrya. Studie uvádějí, že centrozom, který předá spermie při fertilizaci má zcela zásadní úlohu v kontrole prvního buněčného dělení (Munné *et al.*, 1987; Munné *et al.*, 2017). Bohužel to však nevysvětluje, zda by takový mechanismus mohl způsobit vznik tripolární mitózy v druhém či v dalším dělení embrya.

8.2 Důsledky tripolární mitózy

Studie potvrdily jasnou korelaci mezi výskytem tripolární mitózy v prvním buněčném dělení a narušením vývoje embryí a tím i jejich případného implantačního potenciálu. Výskyt tripolární mitózy v pozdějších fázích vývoje má mírnější dopad na kvalitu embryí. Na základě toho bylo potvrzeno, že tripolární mitóza v prvním buněčném dělení má výrazný negativní dopad na vývoj embrya do stádia blastocysty (Hlinka *et al.*, 2012, Kalatova *et al.*, 2015; Meseguer *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2012; Wirka *et al.*, 2014). Wirka *et al.*, 2014 ve své práci uvádí, že embrya, u kterých byla pozorována tripolární mitóza v druhém buněčném dělení, vykazovala vyšší rychlost vývoje do stádia blastocysty než embrya, u kterých byla pozorována tripolární mitóza v prvním buněčném dělení. Uvedl, že embryo, u kterého byla detekována tripolární mitóza v druhém buněčném dělení, bylo transferované ve stádiu blastocysty a úspěšně implantováno. To naznačuje, že výskyt tripolární mitózy v buněčném dělení embrya (mimo prvního buněčného dělení), může být spojováno s mírnějším abnormálním fenotypem, v němž embryo může mít potenciálně méně chromozomálně abnormálních buněk. Ve výsledku to může vést ke kompatibilitě s vývojovým potenciálem daného embrya a schopností implantace. Vysoký výskyt aneuploidie u embryí v důsledku tripolární mitózy naznačuje, že taková embrya by neměla být určena pro transfer do dělohy matky. Transfer takového embrya se uskutečňuje pouze tehdy, pokud pacientka nemá dostatek kvalitních embryí a je řádně poučena o riziku. Pacientka podepisuje informovaný souhlas.

8.3 Výskyt tripolární mitózy

Cílem této diplomové práce byla detekce tripolární mitózy během časného vývoje embryí. Celkový soubor, který byl hodnocen pomocí time-lapse systému, činil 3579 embryí od 429 pacientek. V tomto celkovém souboru byla detekována tripolární mitóza u 95 (2,65 %) embryí u celkově 69 (16,08 %) pacientek. V 92 (2,57 %) případech byla detekována tripolární mitóza v prvním buněčném dělení embrya.

Morfologické hodnocení během časného vývoje embryí pomocí time-lapse systému vykazuje vysokou frekvenci výskytu tripolární mitózy (McCoy *et al.*, 2017). Pomocí time-lapse systému je sledování tripolární mitózy definováno jako dělení jedné blastomery do tří dceřiných blastomer. Nejen, že tripolární mitóza je detekována u 3PN zygot, ale její výskyt je také zaznamenán u 2PN zygot. Výskyt tripolární mitózy je v různých odborných publikacích zaznamenán s velkými odchylkami ve frekvenci (Zhan *et al.*, 2016). Frekvence výskytu tripolární mitózy je udávána v rozmezí od 8,3 % do 26 % (Rubio *et al.*, 2012, Zhan *et al.*, 2016; Kalatova *et al.*, 2015; Wirka *et al.*, 2014., Hlinka *et al.*, 2012). Detekcí a analýzou tripolární mitózy v průběhu embryonálního vývoje se zabývá mnoho prací. Ve své studii Zhan *et al.*, 2016 uvádí frekvenci tripolární mitózy 26,1 % v prvních třech buněčných dělení embrya. Tyto hodnoty jsou dále rozděleny, podle toho, kdy došlo k detekci tripolární mitózy. Uvádí, že frekvence v prvním buněčném dělení embrya byla 9,8 %, v druhém dělení 9,1 % a při třetím dělení 3,7 %. Tato práce je z celkového množství zkoumaných embryí (21 261) největší, která byla doposud publikována. Uvádí, že snímky byly zaznamenávány automaticky každých 10 minut v sedmi ohniskových rovinách. Pro detekci tripolární mitózy je v této studii využit EmbryoScope. Jedním z možných vysvětlení, proč tato studie udává tak vysokou frekvenci tripolární mitózy v časných fázích embryonálního vývoje je, že kritéria k detekci tzv. přímého nerovnoměrného dělení byly použity v širším kontextu. Zhan *et al.*, 2016 uvádí, že přímé nerovnoměrné dělení bylo potvrzeno, pokud bylo pozorováno rozdělení jedné blastomery na tři dceřiné buňky a také pokud interval mezi jednotlivým dělením byl stejný nebo menší než 5 hodin. Bez ohledu na velikost buňky byly považovány za blastomery pouze ty buňky, které obsahovaly viditelné jádro, jinak byly označeny za fragmenty. Z publikovaných dat bylo zjištěno, že buněčný cyklus trvá přibližně 10 až 12 hodin (Rubio *et al.*, 2012). To je interval, který je dostačující, aby došlo k buněčnému dělení embrya a docházelo k duplikaci DNA. Použitím time-lapse systému bylo zjištěno, že velmi krátké buněčné cykly vedou k neúplné replikaci DNA a tím také k nerovnoměrnému rozdělení do blastomer během dělení (Lundin *et al.*, 2001; Salumets *et al.*, 2001). Pokud je tedy interval menší než 5 hodin, mají embrya

signifikantně nižší implantační potenciál, než embrya s normálním buněčným cyklem (Rubio *et al.*, 2012). Wicka *et al.*, 2014 ve své práci uvádí, že byla stanovena frekvence výskytu tripolární mitózy 18,00 % v celkovém souboru sledovaných embryí. Frekvence tripolární mitózy v prvním buněčném dělení činila 8,3 % a v druhém buněčném dělení 9,2 %. Celkový soubor zahrnoval 651 embryí od 67 pacientů. Vývoj embryí byl zobrazen v systému Eeva s frekvencí pořízení snímků každých 5 minut.

Naše data vykazují oproti dostupným publikacím menší hodnoty ve frekvenci výskytu tripolární mitózy. To může být dáno například velikostí zkoumaného souboru vzorků. Vzhledem k nedostatečnému počtu podobných analýz výskytu tripolární mitózy a variabilitě ve frekvenci výskytu tripolární mitózy, není možné s naprostou jistotou tvrdit, že výsledky této diplomové práce neleží ve statistickém optimu. Jedním z možných vysvětlení, proč tato práce udává nízkou frekvenci výskytu tripolární mitózy v průběhu buněčného dělení embryí, může být také chyba při analýze dat. Daším vysvětlením může být, že soubor vzorků zhodnocených v této diplomové práci pochází převážně z různých evropských populací a frekvence výskytu tripolární mitózy se může lišit v závislosti na genetické variabilitě v různých populacích. Všechny studie, které se zabývaly detekcí tripolární mitózy totožně uvádějí, že pokud jsou porovnávána s kontrolní skupinou embryí, vykazují embrya s detekovanou tripolární mitózou nižší implantační potenciál (Rubio *et al.*, 2012; Hlinka *et al.*, 2012, Kalatova *et al.*, 2015; Wicka *et al.*, 2014, McCoy *et al.*, 2017, Desai *et al.*, 2014)

8.4 Věk matky

Studie, které byly publikovány již dříve, uvádějí jako důvod vzniku tripolární mitózy důsledek abnormální fertilizace oocyty nebo jsou tyto studie založeny na poměrně malé skupině pacientů. Studie neuvádějí, zda byl použit oocyt pacientky nebo darovaný (Kalatova *et al.*, 2015; Desai *et al.*, 2014). Výsledky, které publikoval Zhan *et al.*, 2016 nevykazují významné rozdíly ve výskytu tripolární mitózy v souvislosti mezi věkem matky či otce nebo zda jsou použity oocyty pacientky či darované, což také potvrzují naše data získaná z pozorování. Zhan *et al.*, 2016 dále uvádí, že použití kryokonzervovaných spermií nemělo žádný vliv na výskyt tripolární mitózy. Naopak poukázal na to, že při použití spermií z testikulární/epididymální biopsie se frekvence tripolární mitózy v prvním buněčném dělení embrya zvýšila. Udává, že výskyt tripolární mitózy v prvním dělení embrya byl signifikantně vyšší u spermií

z epididymální biopsie (13,6 %) a spermií z testikulární biopsie (11,4 %) ve srovnání s normálními spermii (9,1 %).

8.5 Medium

Time-lapse systém poskytuje několik výhod pro hodnocení vývoje embryí. S touto technologií je nutné důkladně pochopit kinetiku vývoje embryí a způsobu, jakým mohou být tyto procesy ovlivněny vnějšími i vnitřními faktory. Jedním z příkladů vnějšího faktoru, který může ovlivnit dynamiku vývoje embryí, je typ media, který je používán pro jejich kultivaci. Ve studiích, které se zabývají vztahem mezi kultivačními medií a kinetikou embryí, bylo dosaženo protichůdných závěrů (Desai *et al.*, 2014). Basile *et al.*, 2013 uvádí, že vývoj a kinetika embryí byla podobná pro odlišné typy kultivačních medií. Naopak jiná studie uvádí, že morfokinetické parametry, které slouží jako ukazatele kvality embryí a předpovědi výsledku implantace, musí být v různých kultivačních podmínkách upraveny (Ciray *et al.*, 2012). V námi pozorovaném souboru bylo zjištěno, že tripolární mitóza je detekována nejčastěji v SG (SAGE 1-Step™) mediu (20,34 %), EG mediu (20,00 %). Přítomnost tripolární mitózy byla zaznamenána také v mediu IR (15,63 %) a (QC 13,53 %) a v dalších. Je však nutné uvést, že rozdělení dat, a to především četností využití jednotlivých kultivačních medií bylo nerovnoměrné a bude s velkou pravděpodobností zdrojem systematické chyby. Pokud bych však porovnála media, ve kterých bylo zastoupení tripolární mitózy největší, předpokládala bych, že kultivační media nemají vliv na vznik tripolární mitózy. Toto je však pouze předpověď, která se neopírá o žádné relevantní údaje. Ve studii Zhan *et al.*, 2016 uvádí, že frekvence výskytu tripolární mitózy v závislosti na typu použitého média je přibližně stejná. Jedná se však o předběžné údaje a výsledky nebyly doposud publikovány.

8.6 Time-lapse systém

Kontinuální, neinvazivní sledování vývoje embryí pomocí time-lapse systému umožňuje vyhodnotit kvalitu embryí a tím i zjednodušit jejich výběr pro transfer do dělohy matky. Nezbytným krokem k výběru toho nejkvalitnějšího embrya je důležité sestavit obecný model klasifikace embryí pomocí získaných dat. Proto se většina studií zaměřuje na vytvoření optimálních ukazatelů, které udávají, zda existují rozdíly v kinetice vývoje embryí s omezenou schopností implantace a těmi, které jsou častěji spojeny s tvorbou *in vitro* blastocysty anebo

implantací (Desai *et al.*, 2014). Meseguer *et al.*, 2011 publikoval studii, která zaznamenala velký počet transferovaných embryí a ve které byly identifikovány parametry embrya jako ukazatelé potenciálu implantace embrya. Uvádí optimální rozmezí pro každou proměnnou, která koreluje s výrazně vyšší pravděpodobností implantace. Časné první buněčné dělení embrya, které bylo identifikováno v době kontroly v rozmezí 25 až 27 hodin po ICSI a jeho vliv na míru těhotenství bylo nejprve publikováno skupinou Edwards *et al.*, 1984. Všechny publikace se shodují, že transfer embryí, která vykazují časné dělení vede k vyšší míře těhotenství ve srovnání s transferovanými embryii se zpožděným dělením (Meseguer *et al.*, 2011, Lundin *et al.*, 2001; Salumets *et al.*, 2001). V těchto studiích však ve většině případů bylo přistoupeno k transferu více než jednoho embrya, kombinující jak časně se dělící, tak pozdně se dělící embrya. Proto je velice obtížné získat důkaz, že implantace embrya souvisí s tímto parametrem. Proto je v dnešní době ve většině center asistované reprodukce přistoupeno k transferu jediného embrya. To nejen z důvodu, že snižuje míru vícečetného těhotenství, ale jednak je to účinný nástroj, jak kvantifikovat životaschopnost embryí podle určitých parametrů, která byla vybrána pro přenos do dělohy matky. Chamayou *et al.*, 2014 publikoval také časové údaje, které predikují vývoj embryí do stádia blastocysty. Embrya, která vykazují první buněčné dělení v rozmezí 18,4 až 30,9 hodin po ICSI, byla schopna dosáhnout tohoto stádia. Hammond *et al.*, 2015 uvádí, že embrya výborné kvality by měla podstoupit první buněčné dělení přibližně po 25,8 hodinách od fertilizace. I další studie využívá k predikci vývoje embryí do stádia blastocytu tento časový parametr (Lundin *et al.*, 2001).

Některé studie také uvádí, že synchronní dělení embrya během časného vývoje koreluje s nižším výskytem chromozomálních abnormalit (Hardarson *et al.*, 2001). Je důležité ale upozornit, že embrya, u kterých je pozorováno předčasné dělení, které nastává dříve než 20 hodin po fertilizaci, mají horší prognózu. Posouzení časného dělení embrya může být také použito k selekci zygot, které se dělí do tří a více buněk, což je spojeno s výskytem chromozomálních abnormalit (Hardarson *et al.*, 2001). V naší práci byl stanoven průměrný čas 30,76 hodin od fertilizace k detekci tripolární mitózy v prvním buněčném dělení embrya. S 95 % pravděpodobností byla tripolární mitóza detekována v rozmezí 29,43 a 32,08 hodin. Nejkratší doba detekce činila 21 hodin a nejdelší 54 hodin.

Analýza dále spočívá také v morfologickém hodnocení počtu buněk, fragmentace nebo symetrie buněčného dělení (Rubio *et al.*, 2012). V některých studiích byly naopak uvedeny některé parametry, které mohou mít na vývoj a implantační potenciál embryí negativní vliv. Mezi tyto parametry řadíme abnormální první buněčné dělení či fúze blastomer (Lundin *et al.*,

2001; Salumets *et al.*, 2001). Určení správných parametrů pro předpověď kvality embrya a jeho schopnosti se vyvinout do stádia blastocysty je velice důležité, jelikož většina center asistované reprodukce využívá, kultivaci embryí do třetího dne. Vzhledem k tomu, že některým embryím nevyhovují kultivační podmínky, nejsou proto schopna se v kultuře vyvíjet do stádia blastocysty. (Martins *et al.*, 2016). Vysokou prevalenci tripolární mitózy v cyklech IVF nelze v rutinních IVF postupech ignorovat. Tyto abnormálně dělící se embrya jsou velice často vybírána pro přenos do dělohy matky, vzhledem ke konvenčnímu způsobu hodnocení embryí. Pro detekci tripolární mitózy je nutné používat systémy, které kontinuálně snímají vyvíjející se embrya. Proto je velice nutné, aby time-lapse systém byl zaveden v každé laboratoři asistované reprodukce (Desai *et al.*, 2014).

8.7 Bezpečnost time-lapse systému

Použití time-lapse systému nám zpřístupnilo pochopení morfologických mechanismů vývoje a chování preimplantačních embryí. Navíc time-lapse systém poskytuje z pořízených snímků užitečné informace pro výběr nejkvalitnějšího embrya pro implantaci (Nakahara *et al.*, 2010). Je však důležité zkoumat bezpečnost tohoto systému (Kirkegaard *et al.*, 2012). Embrya kultivována v inkubátoru s integrovaným optickým mikroskopem jsou pravidelně vystavena světlu při získávání digitálních obrazů. Je pouze málo informací o účincích světla na lidská embrya a tyto účinky by měly být posouzeny před klinickým použitím time-lapse systému (Nakahara *et al.*, 2010). V průběhu monitorování vývoje embryí pomocí time-lapse systému dochází nejen k periodické expozici světla, ale také k akumulaci tepla z pohyblivých částí vybavení, kdy jsou embrya posouvána jedno po druhém do zorného pole integrovaného mikroskopu z důvodu pořízení snímku v předem daných časových intervalech (Ottosen *et al.*, 2007; Kirkegaard *et al.*, 2012; Nakahara *et al.*, 2010). Byla porovnávána morfologie embryí, která byla oplodněna pomocí metody ICSI. Pro posouzení účinků světla z integrovaného optického mikroskopu byly náhodně vybrány oocyty a rozděleny do dvou skupin. V první skupině byla morfologie oplodněných oocytů a dalšího vývoje embrya hodnocena pomocí time-lapse systému. Ve druhé skupině byla morfologie embryí hodnocena konvenčním pozorováním. Bylo prokázáno, že neexistují žádné významné rozdíly v morfologii embryonálního vývoje mezi těmito skupinami (Nakahara *et al.*, 2010). I několik dalších studií potvrdilo stejný závěr a to, že time-lapse systém nepoškozuje kvalitu embryí při kontinuálním sledování a nemá také významný vliv na jejich vývoj (Cruz *et al.*, 2011; Kirkegaard *et al.*, 2012; Ottosen *et al.*, 2007).

9 Souhrn

Tato práce se především zabývala detekcí tripolární mitózy v prvním a v druhém buněčném dělení embrya pomocí time-lapse systému (Primo Vision). Tento systém umožňuje kontinuální sledování vývoje embryí a tím také poskytuje velice důležité údaje, které embryolog potřebuje pro selekci toho nejvyššího embrya pro transfer do dělohy matky.

V současnosti existuje několik stovek markerů pro posouzení kvality embrya a také k predikci jejich implantačního potenciálu. Kromě toho mohou být naopak detekovány pomocí time-lapse systému určité anomálie, které u preimplantačních embryí často pozorujeme. Detekce abnormalit v buněčném dělení embryí umožňuje selektovat embrya s chromozomálními abnormalitami, což ve výsledku vede ke snížení incidence časných abortů. Proto je velice důležité využívat parametry pro výběr nejvyššího embrya. Pomocí time-lapse systému můžeme predikovat kvalitu embrya již ve fázi časného dělení, jelikož platí, že čím dříve dochází k poruchám v buněčném dělení embrya, tím závažnější dopad to na životaschopnost daného embrya má. Pomocí kontinuálního sledování vývoje embryí můžeme jeho kvalitu určit s použitím vhodných parametrů již druhý den kultivace. Tyto parametry zahrnují dobu trvání první cytokineze, dobu mezi první a druhou mitózou a dobu mezi druhou a třetí mitózou. Měření těchto parametrů nám pak může poskytnout informace o riziku vzniku chromozomálních odchylek v průběhu embryonálního vývoje.

V této práci bylo vyšetřeno 429 pacientek, které od ledna 2014 do prosince 2014 podstoupily v Prague Fertility Center léčbu neplodnosti. Nejčastější důvody byly tubulární sterilita, endometrióza, dárčovství oocytů či andrologicky podmíněná neplodnost. Pomocí time-lapse systému Primo Vision bylo vyšetřeno 3579 embryí od 429 pacientek. Tripolární mitóza byla detekována u 95 (2,65 %) embryí od 69 (16,08 %) pacientek. A ze statistické analýzy vypracovaných dat byl hodnocen možný vliv určitých faktorů na vznik tripolární mitózy. Vliv zkoumaných faktorů na vznik tripolární mitózy nebyl prokázán.

Time-lapse systém poskytuje možnost objektivního posouzení vývojové kompetence embrya, proto je považován za jeden z nejvíce ceněných diagnostických prostředků v léčbě neplodnosti. Zdokonalováním postupů a postupné nalézání nových markerů pro výběr toho nejlepšího embrya může být ovlivňována míra úspěšnosti IVF. Je velmi důležité zdůraznit, že použití konvenčního pozorování v diagnostice vývoje embryí a posouzení jejich kvality není dostatečné pro detekci veškerých abnormalit, které mohou v průběhu embryonálního vývoje nastat. Příkladem může být již zmiňovaná detekce výskytu tripolární mitózy. Proto by time-

lapse systém měl být používán nejen v programech s transferem pouze jediného embrya, kdy je velmi důležité vybrat to nejkvalitnější embryo. Pomocí time-lapse systému by měl být sledován celkový soubor embryí od pacientek bez ohledu na to k jaké strategii přenosu je přistoupeno. Aby bylo možné detekovat a studovat výskyt tripolární mitózy v lidských embryích, je nutné využívat time-lapse systémy.

10 Seznam použité literatury

- Adhikari, D., & Liu, K.** (2014). The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 480-487.
- Anderhub, S. J., Krämer, A., & Maier, B.** (2012). Centrosome amplification in tumorigenesis. *Cancer Letters*, 322(1), 8-17.
- Baart, E. B., Martini, E., van den Berg, I., Macklon, N. S., Galjaard, R. H., Fauser, B. C. J. M., & Van Opstal, D.** (2005). Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 21(1), 223-233.
- Bączkowski, T., Kurzawa, R., & Głabowski, W.** (2004). Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reproductive biology*, 4(1), 5-22.
- Basile, N., Morbeck, D., García-Velasco, J., Bronet, F., & Meseguer, M.** (2013). Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Human Reproduction*, 28(3), 634-641.
- Ciray, H. N., Aksoy, T., Goktas, C., Ozturk, B., & Bahceci, M.** (2012). Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet*, 29, 891-900.
- Conlin, L. K., Thiel, B. D., Bonnemann, C. G., Medne, L., Ernst, L. M., Zackai, E. H., ... & Spinner, N. B.** (2010). Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Human molecular genetics*, 19(7), 1263-1275.
- Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K. S., Martínez, M., Pérez-Cano, I., ... & Meseguer, M.** (2011). Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(7), 569-573.
- Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., & Meseguer, M.** (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive biomedicine online*, 25(4), 371.
- De Placido, G., Wilding, M., Strina, I., Alviggi, E., Alviggi, C., Mollo, A., ... & Dale, B.** (2002). High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Human Reproduction*, 17(9), 2402-2409.
- Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L. R., Austin, C., Goldberg, J., & Falcone, T.** (2014). Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 54.
- Dodson, H., Bourke, E., Jeffers, L. J., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S., ... & Morrison, C.** (2004). Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *The EMBO Journal*, 23(19), 3864-3873.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., & Tews, G.** (2003). Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Human reproduction update*, 9(3), 251-262.
- Edwards, R. G., Fishel, S. B., Cohen, J., Fehilly, C. B., Purdy, J. M., Slater, J. M., ... & Webster, J. M.** (1984). Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 1(1), 3-23.
- Eggermann, T.), Soellner, L.), Buiting, K.), & Kotzot, D.).** (2015). Mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis. *Trends In Molecular Medicine*, 21(2), 77-87. doi:10.1016/j.molmed.2014.11.010

- Fukasawa, K.** (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Letters*, 230(1), 6-19.
- Gardner, D. K., Meseguer, M., Rubio, C., & Treff, N. R.** (2015). Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Human reproduction update*, 21(6), 727-747.
- Gardner, David K., Denny SAKKAS, Emre SELI a Dagan WELLS.** *Human gametes and preimplantation embryos: assessment and diagnosis*. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-6650-5.
- Godinho, S. A., Kwon, M., & Pellman, D.** (2009). Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer Metastasis Rev*, 28, 85-98.
- Hacker, F. M., Whalen, P. S., Lee, V. R., & Caughey, A. B.** (2015). Maternal and fetal outcomes of pancreatitis in pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 213(4), 568-e1.
- Hammond, E. R., Stewart, B., Peek, J. C., Shelling, A. N., & Cree, L. M.** (2015). Assessing embryo quality by combining non-invasive markers: early time-lapse parameters reflect gene expression in associated cumulus cells. *Human Reproduction*, 30(8), 1850-1860.
- Hanashiro, K., Kanai, M., Geng, Y., Sicinski, P., & Fukasawa, K.** (2008). Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Oncogene*, 27(40), 5288.
- Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., & Lundin, K.** (2001). Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Human Reproduction*, 16(2), 313-318.
- Hassold, T., & Hunt, P.** (2001). TO ERR (MEIOTICALLY) IS HUMAN: THE GENESIS OF HUMAN ANEUPLOIDY. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), 280-291.
- Hlinka, D., Kal'atova, B., Uhrinova, I., Dolinska, S., Rutarova, J., Rezacova, J., ... & Dudas, M.** (2012). Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiological research*, 61(5), 513.
- Humphries, L. A., Chang, O., Humm, K., Sakkas, D., & Hacker, M. R.** (2016). Influence of race and ethnicity on in vitro fertilization outcomes: systematic review. *American journal of obstetrics and gynecology*, 214(2), 212-e1.
- Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, G., Tomaselli, V., Alecci, C., Ragolia, C., ... & Guglielmino, A.** (2013). The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(5), 703-710.
- Chian, R. C., Buckett, W. M., Tulandi, T., & Tan, S. L.** (2000). Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction*, 15(1), 165-170.
- Kalatova, B., Jesenska, R., Hlinka, D., & Dudas, M.** (2015). Tripolar mitosis in human cells and embryos: occurrence, pathophysiology and medical implications. *Acta histochemica*, 117(1), 111-125.
- Kirkegaard, K., Agerholm, I. E., & Ingerslev, H. J.** (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human reproduction*, 27(5), 1277-1285.
- Kirkegaard, K., Hindkjaer, J. J., Grøndahl, M. L., Kesmodel, U. S., & Ingerslev, H. J.** (2012). A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(6), 565-572.
- Kirkegaard, K., Kesmodel, U. S., Hindkjær, J. J., & Ingerslev, H. J.** (2013). Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Human Reproduction*, 28(10), 2643-2651.
- Kola, I., Trounson, A., Dawson, G., & Rogers, P.** (1987). Trippronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biology of reproduction*, 37(2), 395-401.

- Kovacs, P.** (2014). Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 124.
- Kuliev, A., & Verlinsky, Y.** (2004). Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Human reproduction update*, 10(5), 401-407.
- Kwon, M., Godinho, S. A., Chandhok, N. S., Ganem, N. J., Azioune, A., They, M., & Pellman, D.** (2008). Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes & development*, 22(16), 2189-2203.
- Lagalla, C., Tarozzi, N., Sciajno, R., Wells, D., Di Santo, M., Nadalini, M., ... & Borini, A.** (2017). Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reproductive biomedicine online*, 34(2), 137-146.
- Lapunzina, P., & Monk, D.** (2011). The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. *Biology of the Cell*, 103(7), 303-317.
- Lara-Gonzalez, P., Scott, M. I. F., Diez, M., Sen, O., & Taylor, S. S.** (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *Journal of Cell Science*, 124(24), 4332-4345. <http://doi.org/10.1242/jcs.094763>
- Liehr, T.** (2010). Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). *Molecular cytogenetics*, 3(1), 8.
- Lundin, K., Bergh, C., & Hardarson, T.** (2001). Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Human Reproduction*, 16(12), 2652-2657.
- Maheshwari, A., Hamilton, M., & Bhattacharya, S.** (2016). Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage?. *Reproductive BioMedicine Online*, 32, 142-146.
- Mantikou, E., Wong, K. M., Repping, S., & Mastenbroek, S.** (2012). Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1921-1930.
- Martins, W. P., Nastri, C. O., Rienzi, L., Van der Poel, S. Z., Gracia, C., & Racowsky, C.** (2017). Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 49(5), 583-591.
- Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J. C., Verhoeve, H. R., ... & Buys, C. H.** (2007). In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *New England Journal of Medicine*, 357(1), 9-17
- McCoy, R. C.** (2017). Mosaicism in preimplantation human embryos: when chromosomal abnormalities are the norm. *Trends in Genetics*, 33(7), 448-463.
- Meraldi, P., Honda, R., & Nigg, E. A.** (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *The EMBO journal*, 21(4), 483-492.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohí, J.** (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction*, 26(10), 2658-2671.
- Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., & Requena, A.** (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and sterility*, 98(6), 1481-1489.
- Montag, Markus.** *A practical guide to selecting gametes and embryos*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, [2014]. ISBN 1842145479.
- Motato, Y., de los Santos, M. J., Escriba, M. J., Ruiz, B. A., Remohí, J., & Meseguer, M.** (2016). Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertility and sterility*, 105(2), 376-384.
- Munné, S., & Cohen, J.** (1998). Chromosome abnormalities in human embryos. *Human reproduction update*, 4(6), 842-855.

- Munné, S., & Wells, D.** (2017). Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertility and sterility*, *107*(5), 1085-1091.
- Munné, S., Grifo, J., & Wells, D.** (2016). Mosaicism: “survival of the fittest” versus “no embryo left behind”. *Fertility and sterility*, *105*(5), 1146-1149.
- Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Suzuki, M., Ienaga, M., ... & Ando, H.** (2010). Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *27*(2-3), 93-96.
- Neri, Q. V., Lee, B., Rosenwaks, Z., Machaca, K., & Palermo, G. D.** (2014). Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium*, *55*(1), 24-37.
- Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C., & Pera, R. A. R.** (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, *139*(5), 829-841
- Niemitz, E. L., & Feinberg, A. P.** (2004). Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *The American Journal of Human Genetics*, *74*(4), 599-609.
- Nigg, E. A., & Stearns, T.** (2011). The centrosome cycle: centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature cell biology*, *13*(10), 1154.
- Ottolini, C. S., Kitchen, J., Xanthopoulou, L., Gordon, T., Summers, M. C., & Handyside, A. H.** (2017). Tripolar mitosis and partitioning of the genome arrests human preimplantation development *in vitro*. *Scientific Reports*, *7*, 9744.
- Ottosen, L. D., Hindkjær, J., & Ingerslev, J.** (2007). Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *24*(2-3), 99-103.
- Palermo, G. D., Schlegel, P. N., Hariprashad, J. J., Ergün, B., Mielnik, A., Zaninovic, N., ... & Rosenwaks, Z.** (1999). Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Human reproduction*, *14*(3), 741-748.
- Panagopoulos, I.** (2008). When the genome plays dice: circumvention of the spindle assembly checkpoint and near-random chromosome segregation in multipolar cancer cell mitoses. *PLoS One*, *3*(4), e1871.
- Papanikolaou, E. G., Camus, M., Kolibianakis, E. M., Van Landuyt, L., Van Steirteghem, A., & Devroey, P.** (2006). In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *New England Journal of Medicine*, *354*(11), 1139-1146.
- Racowsky, C., Schlegel, P. N., & Van Voorhis, B. J.** (2009). Biennial Review of infertility.
- Robinson, W. P.** (2000). Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays*, *22*(5), 452-459.
- Rubio, I., Galán, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herrero, J., & Meseguer, M.** (2014). Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and sterility*, *102*(5), 1287-1294.
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M. J., ... & Meseguer, M.** (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and sterility*, *98*(6), 1458-1463.
- Sachdev, N. M., Maxwell, S. M., Besser, A. G., & Grifo, J. A.** (2017). Diagnosis and clinical management of embryonic mosaicism. *Fertility and sterility*, *107*(1), 6-11.
- Sakakibara, Y., Hashimoto, S., Nakaoka, Y., Kouznetsova, A., Höög, C., & Kitajima, T. S.** (2015). Bivalent separation into univalents precedes age-related meiosis I errors in oocytes. *Nature communications*, *6*, 7550.
- Salumets, A., Hydén-Granskog, C., Suikkari, A. M., Tiitinen, A., & Tuuri, T.** (2001). The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Human Reproduction*, *16*(10), 2177-2181.

Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., & Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human reproduction*, 15(11), 2394-2403.

Srsen, V., & Merdes, A. (2006). The centrosome and cell proliferation. *Cell division*, 1(1), 26.

Sunde, A., Brison, D., Dumoulin, J., Harper, J., Lundin, K., Magli, M. C., ... & Veiga, A. (2016). Time to take human embryo culture seriously. *Human Reproduction*, 31(10), 2174-2182.

Taylor, T. H., Gitlin, S. A., Patrick, J. L., Crain, J. L., Wilson, J. M., & Griffin, D. K. (2014). The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Human reproduction update*, 20(4), 571-581.

Tesarik, J., & Mendoza, C. (1996). Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Human Reproduction*, 11(4), 772-779.

Tesarik, J., Mendoza, C., & Greco, E. (2002). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*, 17(1), 184-189.

Trávník, P. (2015). Moderní tendence ve stimulaci ovarií. *Prakt lékařem*, 11(4), 123-125.

Van Voorhis, B. J. (2007). In vitro fertilization. *New England Journal of Medicine*, 356(4), 379-386.

Webster, A., & Schuh, M. (2017). Mechanisms of aneuploidy in human eggs. *Trends in cell biology*, 27(1), 55-68.

Wirka, K. A., Chen, A. A., Conaghan, J., Ivani, K., Gvakharia, M., Behr, B., ... & Shen, S. (2014). Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertility and Sterility*, 101(6), 1637-1648.

Xu, X., Weaver, Z., Linke, S. P., Li, C., Gotay, J., Wang, X. W., ... & Deng, C. X. (1999). Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Molecular cell*, 3(3), 389-395.

Zhan, Q., Ye, Z., Clarke, R., Rosenwaks, Z., & Zaninovic, N. (2016). Direct unequal cleavages: embryo developmental competence, genetic constitution and clinical outcome. *PloS one*, 11(12), e0166398.

Obrázek č. 7: Atlas of human embryology dostupné na:

<http://atlas.eshre.eu/es/14546650461602050>

Obrázek č. 28-29: dostupné na: <https://www.vitrolife.com/en/products/time-lapse-systems/primovision-time-lapse-system/>