

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Monitoring časného vývoje embrya a úspěšnost implantace**

Olomouc 2018

RNDr. Blažena Zbořilová

**Lékařská biologie**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že disertační práce byla vypracována samostatně pod vedením Prof. MUDr. Ivany Oborné, Ph.D. a Mgr. Jiřího Novotného, Ph.D. V seznamu literatury jsou uvedeny všechny použité literární a odborné zdroje.

## **Anotace**

V předložené disertační práci se zabývám ověřením přínosu kontinuálního monitoringu časného vývoje embrya s použitím time-lapse monitorovacího systému Primo Vision. Pro tento účel jsem porovnála úspěšnost metod asistované reprodukce, kdy byly provedeny embryotransfery na základě standardního morfologického statického hodnocení embryí a embryotransfery na základě posouzení dynamiky vývoje embrya metodou kontinuálního monitorování. Zároveň v práci ověřuji přínos transferového média EmbryoGlue na implantaci embryí v porovnání se standardními one-step médii G-TL (Vitrolife, Švédsko) a SAGE 1-step (Origio, Dánsko). Dále se věnuji porovnání vlivu obou metod selekce embryí na těhotenskou ztrátu v programu asistované reprodukce. Studie byla provedena na 484 pacientkách podstupujících léčbu neplodnosti v IVF centru Fertimed v Olomouci. Výsledky disertační práce mohou významně pomoci v klinické praxi při léčbě neplodnosti zlepšením výběru vhodného embrya k embryotransferu a zvýšením pravděpodobnosti jeho implantace.

**Klíčová slova:** IVF, embryo monitoring, embryotranfer, EmbryoGlue, implantace

## **Annotation**

In the submitted presentation, I deal with the verification of the benefit of the continuous monitoring of early embryonic development using the Primo Vision time-lapse monitoring system. For this purpose, I compared the success rate of the assisted reproduction methods when the embryo transfers were carried out on the basis of standard morphological static assessment of the embryo and on the basis of the dynamics of embryonic development assessment through continuous monitoring. The work verifies the benefit of the EmbryoGlue transfer medium on embryo implantation compared to standard G-TL (Vitrolife, Sweden) and SAGE 1- step (Origio, Denmark) one-step media at the same time. Further, it deals with the comparison of the influence of both methods of embryo selection on pregnancy loss in the assisted reproduction programme. The study was carried out on 484 patients undergoing infertility treatment in the IVF centre of Fertimed in Olomouc. The outcomes of the dissertation can help significantly in clinical practice when treating infertility through the improvement of the selection of a suitable embryo for embryo transfer and an increase in the probability of its implantation.

**Key words:** IVF, embryo monitoring, embryo transfer, EmbryoGlue, implantation

## Obsah

1	Úvod.....	8
1.1.1	Oocyt.....	8
1.1.2	Spermie.....	9
1.1.3	Gametogeneze a meióza.....	12
1.1.4	Meióza.....	14
1.1.5	Oogeneze.....	16
1.1.6	Spermatogeneze.....	18
1.2	Oplození a časný vývoj embrya.....	22
1.3	<i>In vitro</i> fertilizace.....	25
1.4	Výběr embryí, systémy hodnocení v jednotlivých stádiích vývoje.....	27
1.4.1	Kontinuální monitoring vývoje embryí.....	27
1.4.2	Individuální hodnocení embryí.....	32
1.5	Faktory ovlivňující časný vývoj embrya.....	36
1.6	Faktory ovlivňující implantaci, MZT, DZT.....	38
2	CÍL.....	42
3	MATERIÁL A METODIKA.....	43
3.1	Ovariální stimulace, odběr oocytů a kultivace embryí.....	43
3.2	Kultivační média a misky.....	43
3.3	Selekce embryí a embryotransfer.....	44
3.4	Těhotenství.....	44
3.5	Transferové médium EmbryoGlue.....	44
3.6	Kontinuální monitoring.....	45
3.7	Statistická analýza.....	45
4	VÝSLEDKY.....	46
4.1	Porovnání EmbryoGlue a klasického kultivačního média.....	46
4.2	Výsledky porovnání Primo Vision a klasické kultivace.....	49

5	DISKUSE .....	51
5.1	Porovnání EmbryoGlue a klasického kultivačního média .....	51
5.2	Porovnání Primo Vision a klasické kultivace.....	52
6	ZÁVĚRY.....	55
7	Souhrn .....	56
8	Summary .....	58
9	Literatura .....	60
10	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	83
11	<b>Seznam tabulek</b> .....	85
12	<b>Seznam obrázků</b> .....	86
13	<b>Vlastní publikace, postery, přednášky</b> .....	88
14	<b>Přílohy</b> .....	94

## **Poděkování**

Chci poděkovat především svým školitelům Prof. MUDr. Ivaně Oborné, Ph.D. za velikou zkušenost, trpělivost a cenné rady, stejně tak Prof. MVDr. Emilu Tkadlecovi CSc. a Mgr. Jiřímu Novotnému, Ph.D. za odbornou pomoc a Doc. MUDr. Aleši Sobkovi CSc. za umožnění studia při zaměstnání a odborné rady.

Děkuji rovněž doc. RNDr. Vladimíru Divokému, Ph. D., vedoucímu Ústavu biologie LF UP, za podporu a možnost zpracování tohoto mezioborového tématu.

Závěrem děkuji své rodině za podporu a trpělivost. Zejména manželovi, dcerce a mým rodičům, bez jejichž pomoci by tato práce vznikala jen velmi obtížně.

Práce byla podpořena studentskou grantovou soutěží na Univerzitě Palackého v Olomouci, grant. č. IGA\_LF\_2014\_009.

RNDr. Blažena Zbořilová

# 1 Úvod

Současným trendem asistované reprodukce je dosažení jednočetného těhotenství po přenosu jedné blastocysty do optimálně připravené děložní sliznice a kryokonzervace zbylých blastocyst. Výběr embrya k přenosu je klíčový a je ovlivněn řadou faktorů, které tomuto stadiu vývoje embrya předcházejí. Proto shrnuji biologii pohlavních buněk, folikulogenezi, spermatogenezi, oplození, časný vývoj embryí a systémy jejich hodnocení v jednotlivých raných fázích vývoje včetně monitoringu a výběr embrya k embryotransferu. V implantaci jsem se zaměřila na studium vlivu transferového média EmbryoGlue.

## 1.1.1 Oocyt

Ženské pohlavní buňky se vyvíjejí v kůře vaječníků. Zralý oocyt v MII zracího dělení (obr. 1) je kulovitá buňka o průměru kolem 120  $\mu\text{m}$ . Oocyt je obklopen kumulem, se kterým je v úzkém kontaktu. Vnější obal tvoří zona pellucida, pod níž a cytoplazmatickou membránou se nachází tzv. perivitellinní prostor, ve kterém nalezneme vlastní buňku a první pólové tělísko. Oocyt obsahuje cytoskelet, mikrotubuly slouží především k intracelulárnímu transportu, aktin tvoří vrstvu pod buněčnou membránou a síť v cytoplazmě a také pruh do oblasti metafázových chromozomů, které jsou obvykle uspořádány v blízkosti prvního pólocyту. Není zatím zformováno jádro a chybí centriol. V cytoplazmě je přítomno asi 100 000 mitochondrií, tvořících komplexy s tubuly hladkého endoplazmatického retikula (Giles 1980, Sathananthan *et al.* 2006). Mateřské mitochondrie jsou jediným zdrojem budoucích embryonálních mitochondrií. Hladké endoplazmatické retikulum obsahuje zásobu vápníkových iontů, nezbytných pro aktivaci oocytu po oplození. Oocyt přináší embryu jednu sadu autosomů, jeden chromozom X (vajičko nedeterminuje pohlaví), mitochondrie, velké množství RNA různých typů (mRNA, circRNA, miRNA, miR-10A, miR-100, miR-184, miR193a-5p, miR-297, miR-602, miR-625), ribozomální podjednotky, cytoplasmu s celou řadou buněčných struktur. Oproti předchozím vývojovým stadiím se snižuje množství endoplazmatického retikula a cisteren Golgiho aparátu (Dvořák *et al.* 1987). Ve zralém oocytu neprobíhá syntéza nukleových kyselin a nenachází se zde centrosom. Pod cytoplazmatickou membránou je rozmístěná vrstva kortikálních granul, které obsahují hydrolytické enzymy a polysacharidy, které jsou klíčové pro kortikální reakci. Oocyt neobsahuje zásobní lipidy ani sacharidy, je vyživován difúzí z okolí. Jako zdroj energie mu slouží zejména pyruvát, cytoplazma je čirá. Před ovulací jsou přímo v oocytu nebo



v granulózových buňkách syntetizované tzv. maternal determinants, jedná se o subpopulaci organel, molekul RNA a proteinů (Kloc *et al.* 2016).



Obrázek 1 Zralý oocyt v metafázi II zracího dělení (foto Zbořilová)

### 1.1.2 Spermie

Spermie vznikají v průběhu spermatogeneze v semenotvorných kanálcích varlete. Tvorba je řízena sekrecí gonadotropních hormonů a pro spermiogenezi je nutná i vysoká lokální koncentrace testosteronu, kterou zajišťují intersticiální Leydigovy buňky.

Spermie je malá (tab. 1) pohyblivá buňka (rychlost pohybu 1-4 mm/min = 10-60  $\mu\text{m/s}$ ), přičemž se pohybuje po rovné, rotující linii (Janick a MacLeod 1970). Aktivita spermií stoupá při zvyšování teploty, což zrychluje jejich metabolismus a zkracuje životnost; je stimulována mírně alkalickým prostředím, silně kyselé prostředí spermie ničí. Stavba spermie je přizpůsobena pohybu a průniku hustým poševním sekretem. Skládá se z oválné hlavičky, která je ze strany zploštělá, střední části a bičíku (obr. 2). Velkou část hlavičky tvoří jádro obsahující haploidní sadu silně kondenzovaných chromozomů (viz dále) a často i vakuoly. Přední část hlavičky je překryta akrozomem, který obsahuje hydrolytické enzymy - hyaluronidázu, akrosin a proakrosin (Yanagimachi 1989). Hyaluronidáza odpovídá za průnik spermie přes cumulus oophorus. Akrosin („zona-penetrating enzyme“) se vyskytuje v

akrozomální matrix a dále pak vázaný na vnitřní akrozomální membránu, asi v 90 % je přítomný ve formě proakrosinu. Akrozom má tvar váčku s dvojitou stěnou a je umístěný na hlavičce spermie. Jeho obsah je homogenní. Distální část akrozomu se nazývá ekvatoriální segment. Spermie je na celém povrchu obalena buněčnou membránou (Baccetti a Afzelius 1976, Serres *et al.* 1983), pod níž leží tenká vrstva cytoplazmy. Buněčná membrána je funkčně diferencovaná, pod ní je na distální části hlavičky, krčku a začátku bičíku silnější vrstva cytoplazmy se strukturami endoplazmatického retikula. Cytoplazma bývá u méně zralých spermií rozšířena v cytoplazmatickou kapku. Pod cytoplazmatickou membránou je přítomna perinukleární theka, obsahující faktor aktivující oocyt, Sperm Oocyte Activating Factor (SOAF) (Sutovsky *et al.* 2003). Další významnou komponentou spermie jsou cytoskeletální proteiny (Escalier 1984).

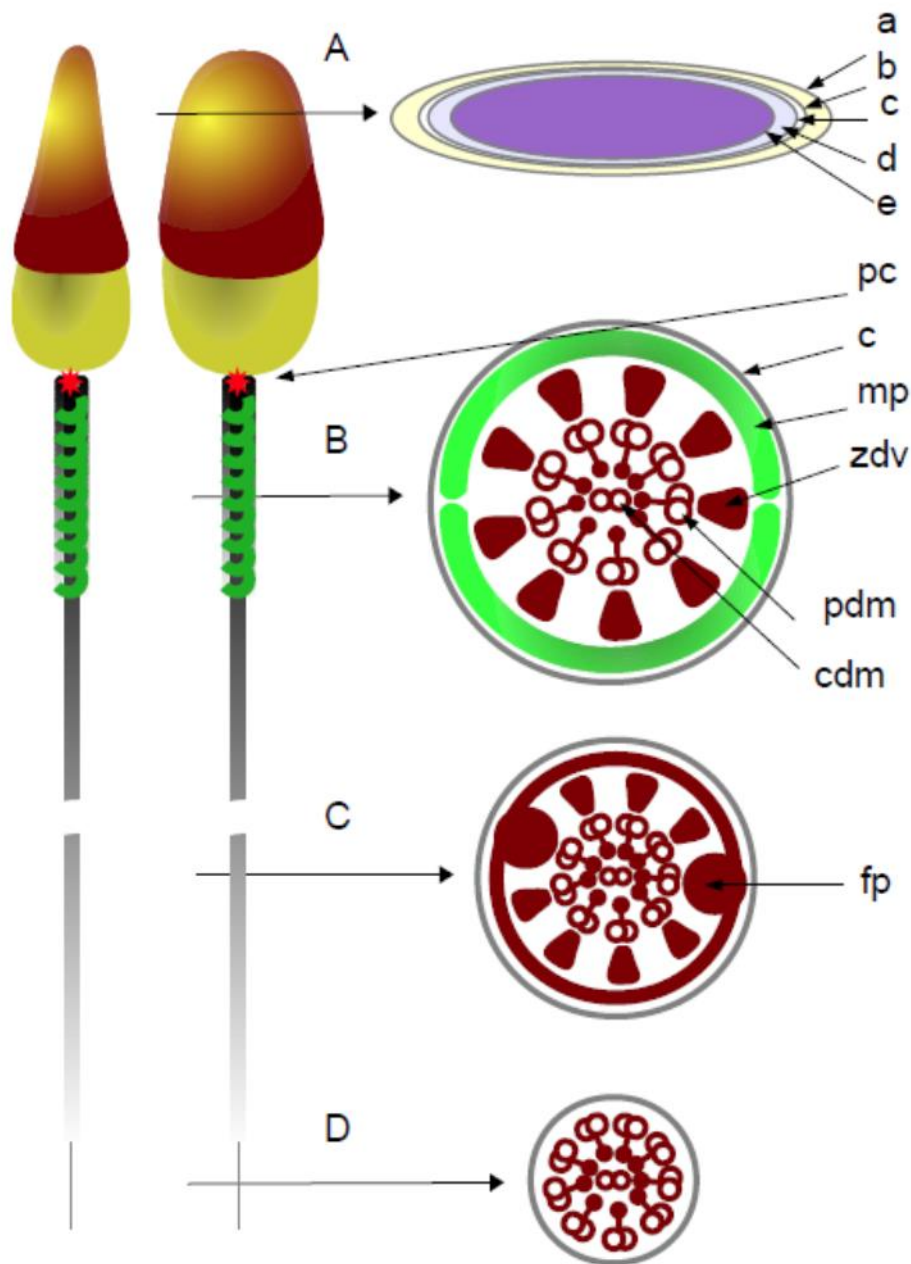
Na bičíku jsou rozlišovány proximální, hlavní a distální oddíl. Proximální část bičíku se nazývá krček, kde je bičík nejširší a zužuje se ke svému konci. Bičík je ukotven bazální ploténkou k distálnímu pólu hlavičky, kde je jaderný obal pokryt četnými póry. Krček spermie obsahuje segmentované chordy, mezi nimi je k ose jádra příčně uložený proximální centriol, obklopený svazkem mikrotubulů (Fawcett 1975, Christopher and Christopher 2002). V krčku začíná struktura axonemy a fibrae densae (Fawcett 1975). Axonema se skládá z 9 periferních a jedné centrální dvojice A a B tubulů, navzájem spojených dyneinovými raménky. Na krček navazuje hlavní oddíl bičíku se stovkou spirálovitě uspořádaných mitochondrií kolem axonematu (Philips a Olson 1975, Sutovsky *et al.* 1999, Sutovsky *et al.* 2000), někteří autoři uvádějí počet mitochondrií nižší, kolem 25-75 (Otani *et al.* 1988, Ho and Wey 2007).

Tabulka 1 Morfologické rozměry lidských spermií (podle Schirren 1982)

Parametr	Velikost ( $\mu\text{m}$ )
Celková délka spermie	55–66
Délka hlavičky	3,4–4,6
Délka středního oddílu bičíku	3,5–5,0
Délka hlavního oddílu bičíku	44–50
Délka distálního oddílu bičíku	4–6
Šířka hlavičky	1,5–2,8
Šířka středního oddílu bičíku	0,8
Šířka hlavního oddílu bičíku	0,5
Šířka distálního oddílu bičíku	0,2

Bičík je obalen zevní pochvou, pod níž je 9 denzích chord obklopujících axonema. Ukončením zevní pochvy přechází hlavní oddíl v distální, kde postupně končí tubuly axonematu, takže se ztrácí jejich typické uspořádání.

Spermie nenesou žádné zásobní látky, ale je vyživována difuzí z okolního prostředí. Zdrojem energie pro spermii je ATP, vznikající v mitochondriální pochvě. Energií získává převážně glykolýzou, důležitou alternativní metabolickou cestou je pentózový cyklus. Spermie jsou schopny využít glukózu, fruktózu, sukcinát, nevyužívají laktát, pyruvát a  $\alpha$ -glycerofosfát.



Obrázek 2 Stavba spermie: A - průřez hlavičkou, B - průřez krčkem, C - průřez hlavním oddílem bičíku, D - průřez terminální částí: a - vnější akrozomální m., b - vnitřní akrozomální m., c - cytoplazmatická m., d - perinukleární matrix, e -

jaderný obal, pc - proximální centriol, mp - mitochondriální pochva, zdv - zevní denzní vlákna, pdm - periferní dvojice mt., cdm - centrální dvojice, mt. fp - fibrózní pochva. (podle Trávník, 2017)

Ve spermiích neprobíhá syntéza nukleových kyselin. Na povrchu spermií jsou vazebná místa pro připojení k druhově specifickým molekulám na povrchu zona pellucida. Pro správnou funkci spermií je důležitá přítomnost draslíku, vápníku, hořčíku a zinku (koncentrace zinku je zde vyšší než v kterékoliv jiné lidské buňce).

Zralá spermie musí aktivně proniknout zátkou cervikálního hlenu, vycestovat děložní dutinou do vejcovodu, projít kumulem oocyty, navázat se na receptory zona pellucida, proniknout přes ni do perivitelinního prostoru, navázat se svým ekvatoriálním segmentem na oolemu a konečně proniknout do oocyty.

Před oplozením dochází ke kapacitaci spermií, což je reverzibilní proces, při kterém jsou z povrchu spermie odstraněny některé glykoproteiny obsažené v seminální plazmě, které snižují pohyblivost spermie, brání její vazbě na zona pellucida, penetraci do vajíčka a zároveň neumožňují spuštění akrozomální reakce. Doba kapacitace je individuální. Asi 10 % spermií je schopno oplození za 2 h, ostatní později. Při kapacitaci se mění poměr cholesterolu a fosfolipidů v buněčné membráně spermie. Ztrátou cholesterolu se zvýší schopnost buněčné membrány spermie splývat s vnější akrozomální membránou a s membránou oocyty. Tento proces je provázen hyperaktivací spermie, která se pohybuje intenzivněji, s větší amplitudou laterálního pohybu. Kapacitovaná spermie má omezenou životnost a dříve zanikne.

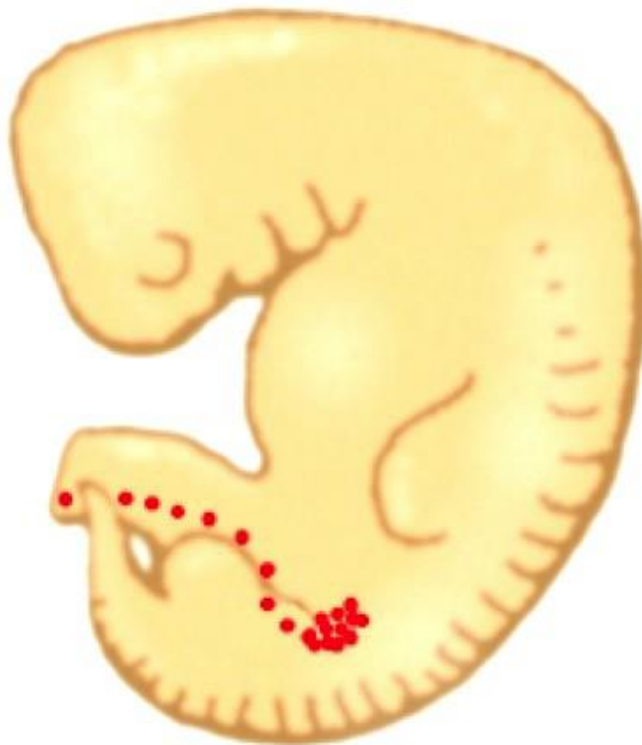
### 1.1.3 Gametogeneze a meióza

Základy pohlavních žláz vznikají během organogeneze, kdy přes dorzální mezenterium doputují primordiálních buňky ze základu žloutkového váčku do genitální lišty. Buňky cestují asi 3 týdny (3. až 6. týden vývoje embrya) a mají rozhodující vliv na další vývoj gonád, kde indukují proliferaci coelomového epitelu a vznik primárních provazců v indifferenčních gonádách (obr. 3). Jestliže prvopohlavní buňky obsahují SRY gen (který je na chromozomu Y), indukují za fyziologických okolností přeměnu primitivní gonády ve varle, pokud ne, vzniká ovarium. Ve výjimečných případech tento gen na chromozomu Y chybí, pak se narodí žena 46, XY, anebo může být tento gen v důsledku nepřesného crosing-overu přenesen na chromozom X, a pak se narodí muž 46, XX. V obou případech se však jedná o infertilní jedince.

U mužského embrya se primordiální buňky stanou součástí semenotvorného epitelu stočených kanálek a diferencují se v diploidní spermatogonie typu A, které jsou uloženy při

bazální membráně stočených kanálků. Proliferace spermatogonií A pokračuje až do puberty, nedochází k meiotickému zrání.

U embryí ženského pohlaví se v embryonálním ovariu primordiální buňky diferencují v oogonie, jejichž dělením vznikají oocyty prvního řádu s jednou vrstvou folikulárních buněk (primordiální folikul). Proliferační fázi oogonií, vstup oocytů do profáze meiózy a tvorbu primordiálního folikulu absolvují pohlavní buňky během několika dnů (Wartenberg 1990). Primordiální pohlavní buňky nebyly v juvenilním ani dospělém ovariu nalezeny (Baker a Eastwood 1983). Ve fetálním ovariu se odehrává podstatná část oogeneze, formování folikulů je u člověka uzavřeno ještě před porodem a oocyty, které nevytvořily primordiální folikuly, v této době degenerují (Midgley a Sadler 1979). Vývoj primordiálního folikulu je zastaven v profázi prvního zracího dělení v diplotenním stadiu, kde zůstávají oocyty až do puberty. V období pohlavního dospívání pokračuje u vybraných oocytů meiotické dělení, které bylo do této doby zastaveno.



Obrázek 3 Migrace primordiálních pohlavních buněk do genitální lišty v 3. až 6. týdnu vývoje embrya. (Trávník 2017)

#### 1.1.4 Meióza

Meióza je vedle mutací hlavním zdrojem diverzity genomu a zároveň zajišťuje zachování konstantního počtu chromozomů, který by se jinak oplozením zdvojnásobil. Při meiotickém dělení proběhne nejprve meióza I a poté meióza II (Vacek *et al.* 2006, Nussbaum *et al.* 2004).

Před prvním meiotickým dělením proběhne vždy S-fáze, takže množství jaderné DNA se zdvojnásobí, ale mezi 1. a 2. meiotickým dělením již S-fáze chybí. Po ukončení meiózy vznikají čtyři haploidní buňky (23 chromozomů).

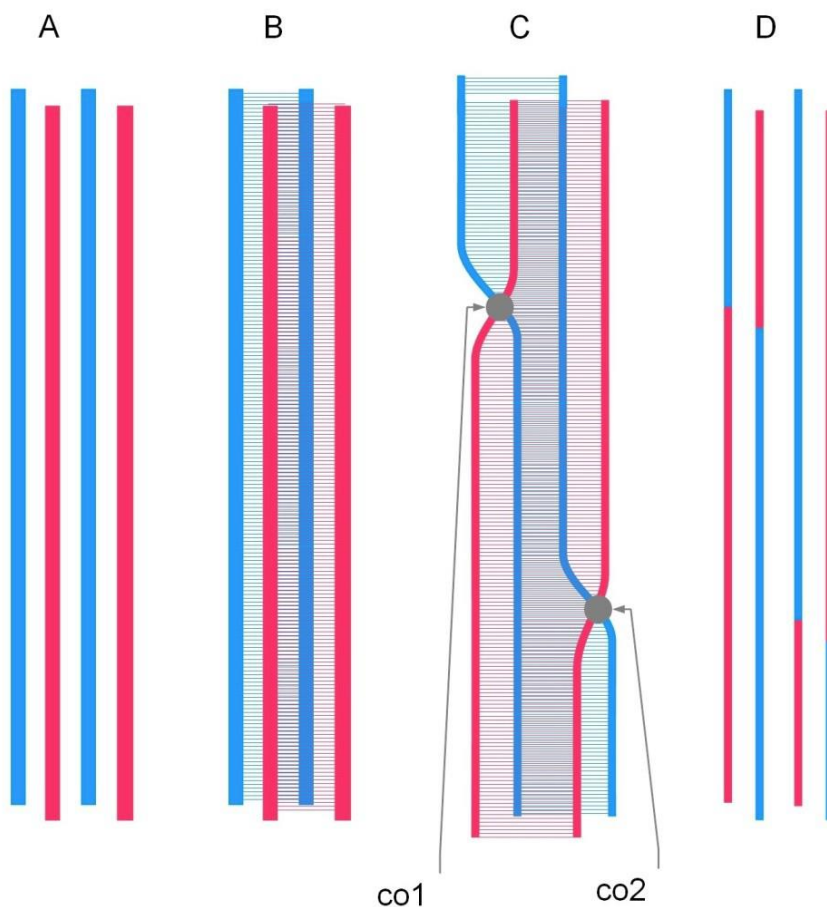
Meióza I se skládá z profáze I (stadium leptotenní, zygotenní, pachytenní, diplotenní a diakineze), prometafáze I, metafáze I, anafáze I, telofáze I a cytokinéze. Jejím výsledkem jsou dvě buňky s haploidním počtem chromozomů. Každý chromozom obsahuje dvě sesterské chromatidy, které jsou však nestejnocenné, protože při „crossing over“ došlo k výměně částí chromatid.

**Profáze I** je dlouhá, protože se musejí spárovat homologní chromozomy. Párování chromozomů zajišťuje synaptonemální komplex, který se vytváří z několika proteinů. Rozlišujeme následujících pět stadií profáze I:

1. Leptotene: chromozomy kondenzují a párují se; v místech telomer se začínají upínat k jadernému obalu (tzv. fáze kytyce; bouquet stage) (Scherthan 2007) (obr. 4). Chromozomy se díky kondenzaci chromatinu stávají viditelnými jako velice dlouhá a tenká (nitkovitá) vlákna s centrální osou bílkovinné povahy (Snustad a Simmons 2008)
2. Zygotene: vzniká synaptonemální komplex, proteinová struktura žebříčkovité povahy, která spojuje homologní chromozomy (Heyting 1996).
3. Pachytene: vznikají chiazmata (rekombinační uzlíky), obsahující enzymy potřebné pro rekombinaci a opravu DNA (Vacek 2006). Rekombinační uzlíky reprezentují místa „crossing over“, kde dochází k reciproké výměně úseků nesesterských chromatid a tím k nové vazbě genů, protože vyměněné úseky jsou sice identické, ale často nesou různé alely. Průměrný počet rekombinací na lidský spermatocyt je 50 (Barlow a Hulten 1998, Lynn *et al.* 2002, Sun *et al.* 2004). V průběhu meiózy I dochází k náhodné distribuci chromozomů mateřského a otcovského původu do dceřiných buněk. Při haploidním počtu lidských chromozomů vzniká  $2^{23}$  možných kombinací chromozomů (což je 8 388 608 různých kombinací) a crossing over toto ještě mnohonásobně zvyšuje. Při oplození se kombinují dvě sady chromozomů (spermie a oocyt) a tím se diverzifikace dále zvyšuje. Kromě

identických dvojčat nemohou existovat dva lidé se shodným genomem (Wartenberg 1990).

4. Diplotene: rekombinace DNA je dokončena a synaptonemální komplex se rozpadá. Nesesterské chromatidy homologních chromozomů zůstávají spojeny v místech chiazmat, která se posouvají od místa původního crossing-overu směrem ke koncům chromozomů a bivalenty nabývají charakteristického prstencovitého tvaru (Vacek 2006).
5. Diakineze: vrcholí terminalizace chiazmat, zaniká jaderná membrána, mizí jadérko



Obrázek 4 Meióza I - Leptotenní stadium: A – dvě chromatidy otcovského a dvě mateřského původu, B – sesterské chromatidy jsou spojeny synaptonemálními komplexy, C – nesesterské chromatidy se překřížily, překřížení chromatid s rekombinačním uzlíkem, co1 – překřížení chromatid s rekombinačním uzlíkem, co2 – překřížení chromatid s rekombinačním uzlíkem. D – stav ke konci diplotenního stadia s vyměněnými úseky chromatid. (Trávník 2017).

Poté následuje **prometafáze I**, kdy se rozpadá jaderný obal, kinetochory se nachází párově v oblasti centromery každého chromozomu a připojení k nim musí být bipolární, mikrotubuly z obou pólů se musí připojit současně.

Následuje **metafáze I**, při které vzniká z bivalentů složených ze čtyř chromatid dvou chromozomů metafázová ploténka. Pravděpodobnost, že otcovský nebo mateřský chromozom

přejde do budoucí buňky, je stejná, protože orientace bivalentů k pólům dělicího vřeténka je náhodná.

Při **anafázi I** se působením kohezinů uvolní chiasmata. Chromozomy složené ze sesterských chromatid pozměněných při „crossing overu“ se pohybují k opačným pólům buňky. V anafázi často dochází k nondisjunkci, kdy oba homologní chromozomy vycestují ke stejnému pólu a tak vznikne aneuploidie. Při spermatogenezi nastává následně **telofáze I**, kdy se vytváří jaderný obal. Při oogenezi pokračuje meióza II. Posledním stadiem před meiozou II je **cytokineze**, kdy dělením podobným mitóze vznikají při spermatogenezi dvě rovnocenné buňky (spermatocyty 2. řádu nebo spermatocyty II) a při oogenezi jeden oocyt II. řádu a první polocyt.

K chybám při dělení dochází nejčastěji právě při meioze I a to mnohem častěji při oogenezi než při spermatogenezi. Aneuploidie vznikají jako důsledek nondisjunkce chromozomů: při I. meitickém dělení vznikne jedna buňka s dvěma homologními chromozomy a druhá buňka, které daný chromozom chybí. Při následném oplození tak vznikne trisomická, respektive monosomická zygota.

Po meióze I neprobíhá S-fáze, ale následuje meióza II, která je podobná mitotickému dělení. V anafázi II dojde k oddělení sesterských chromatid, které se v telofázi přesunou k opačným pólům buňky. Výsledkem meiózy II jsou dvě haploidní dceřiné buňky vzniklé z mateřské buňky. Chromozomy těchto dceřiných buněk jsou tvořeny jen jednou chromatidou. Oocyty zůstávají v metafázi II a buněčné dělení je dokončeno až po oplození oocytu (Vacek *et al.* 2006, Nussbaum *et al.* 2004).

Pohlavní chromozomy se chovají při meióze jinak než chromozomy somatické. Chromozomy X a Y obsahují krátké pseudoautozomální úseky (tzv. PAR1 a PAR2). U spermií dochází k částečné synapsi mezi chromozomem X a Y v oblasti PAR1 s možnou translokací části chromozomu Y na chromozom X (Solari 1974, Burgoyne 1982, McLaren 1988).

I při meióze II může dojít k nondisjunkci, kdy se v jedné buňce ocitnou dvě sesterské chromatidy a druhá buňka je nulizomní. Při „crossing – over“ mohou vznikat také delece, inverze a translokace.

### 1.1.5 Oogeneze

Oogenezi dělíme na část prenatalní a část postnatalní. V prenatalním období vzniká z primordiální pohlavní buňky gonocyt, poté oogonie a oocyt I. řádu, který je zastaven v meióze I. Postnatalní fáze vývoje zahrnuje folikulogenezi, dokončení meiózy I a začátek



meiózy II, která je dokončena jen v případě oplození oocyty. Neoplozený oocyt zaniká bez dokončené meiózy.

Během prenatální fáze oogeneze jsou primordiální pohlavní buňky schopny amébovitého pohybu. Do 6. týdne vývoje embrya vycestovávají k základům ovarií, která se poté přeměňují v oogonie, kterých je kolem 26 000. Počet oogonií vzroste v 9. týdnu vývoje při přesunu do kůry vyvíjejícího se ovaria až na 250 000. Ve 12. týdnu oogonie vstupují synchronně do mitózy. Vlna proliferace oogonií automaticky přechází do profáze meiózy, pro kterou je typický rytmický průběh a na rozdíl od ostatních mitóz také synchronizace. Oogonie zůstávají spojeny navzájem mezi sebou cytoplazmatickými můstky. Po ukončení proliferační fáze proběhne v oocytech poslední premeiotická S-fáze. Již ve 13. týdnu početné oocyty vstoupí do profáze meiózy I. Začátkem 5. měsíce se zde začne vytvářet zóna oocytů, které započaly tvorbu primordiálních folikulů. Během proliferace oogonií, leptotenního a pachytenního stadia dochází ke snížení počtu oocytů, jen část se stává součástí folikulů, další pokles na 1 – 2 miliony primordiálních folikulů nastává v době do porodu (Trávník 2017). Přerušení meiózy nastává v diplotenním stadiu, kdy homologní chromozomy zůstávají spojeny jen v místech chiasmat. Následně oocyt vstupuje do klidového stadia a vytváří spolu s folikulárními buňkami po ukončení diplotenního stadia primordiální folikul. Těmito primordiálními folikuly je mezi 6. - 7. měsícem vývoje obsazena celá kůra. První zrací dělení je zastaveno v profázi I a oocyt přechází do stadia diktyotene. Postnatálně folikuly zanikají až do puberty, kdy jich zůstává kolem 200 000 v každém ovariu. Většina folikulů podléhá atrezii na principu apoptózy.

Postnatální část folikulogeneze je založena na proliferaci a diferenciaci buněk. Jedná se asi o roční proces, během něhož se primordiální folikul může vyvinout až do ovulačního stadia. Vývoj folikulu je možno rozdělit do dvou fází, na preantrální, která zahrnuje tzv. nábor kohorty primordiálních folikulů a antrální fázi zahrnující vývoj sekundárních folikulů, selekci Graafova folikulu a atrezii ostatních. „Recruitment“ primordiálních folikulů probíhá po celé reprodukční období života ženy až do vyčerpání jejich zásoby v období klimakteria. Tehdy také dochází k ukončení menstruačního cyklu a přechodu do postmenopauzy. Během prvních tří dekád života probíhá „recruitment“ konstantní rychlostí. Kolem věku 37 let, kdy počet primordiálních folikulů dosáhne přibližné hodnoty 25 000, se další rychlost náboru zdvojnásobí (Trávník 2017).

Preantrální období je gonadotropin independentní a nezávisí vůbec na koncentraci FSH. Jedná se o období růstu a diferenciacie folikulů regulovaná růstovými faktory celým spektrem autokrinních a parakrinních mechanismů. Zahrnuje vývoj primordiálního i

primárního folikulu a přechází do vývoje sekundárního, kde je již antrum vyvinuto. Tento vývoj od primordiálního do plně vyvinutého sekundárního folikulu trvá asi 290 dní.

Primordiální folikul obsahuje malý primární oocyt o průměru asi 25  $\mu\text{m}$ . Průměr primárního folikulu vzroste během preantrální fáze z 25 na 120  $\mu\text{m}$ , což souvisí s aktivací genomu oocyty včetně vytvoření zóna pellucida (ZP) na povrchu oocyty. Granulózové buňky se mění z plochých na kubické a vznikají v nich receptory pro FSH. Vyvíjejí se gap junctions mezi folikulárními buňkami a oocytem a primární folikul produkuje autokrinní faktory, zejména GDF-9, BMP-15 a AMH (Králíková *et al.* 2012). Dochází k profílaci dalších vrstev folikulárních buněk, vzniká membrana granulosa, diferencuje se theca folliculi interna a externa a dochází k angiogenezi ve stěně folikulu. Na konci preantrálního období se již jedná o plně vzrostlý oocyt obalený ZP a cca 9 vrstvami folikulárních buněk s vyvinutou lamina basalis, theca interna i externa a kapilární sítí v thece. Ve stadiu profáze meiózy je oocyt udržován vysokou koncentrací cAMP. Po ukončení růstové fáze je oocyt schopen pokračovat v meióze (Mehlmann 2005).

Antrální fáze vývoje folikulu je gonadotropin dependentní a je charakterizována vývojem antra a překotným růstem folikulu, který se ještě urychluje po dosažení průměru 0,4 mm. Doba od zformování antra potřebná k ovulaci trvá asi 60 dní. Většina sekundárních folikulů podléhá atrezii. Pouze folikul s dostatečným počtem FSH receptorů, produkující více estrogenů, dosáhne ovulace. Nezbytnou výživu a regulační signály poskytují oocyty buňky membrána granulosa, bez nichž by neproběhlo jeho zrání. Pík LH (nárůst a následný pokles hladiny LH) spouští také 1. zrací dělení, jehož výsledkem je oocyt v metafázi II. K ovulaci dochází 37-40 h od vzestupu koncentrace LH. Po oplození dojde k dokončení meiózy II.

### 1.1.6 Spermatogeneze

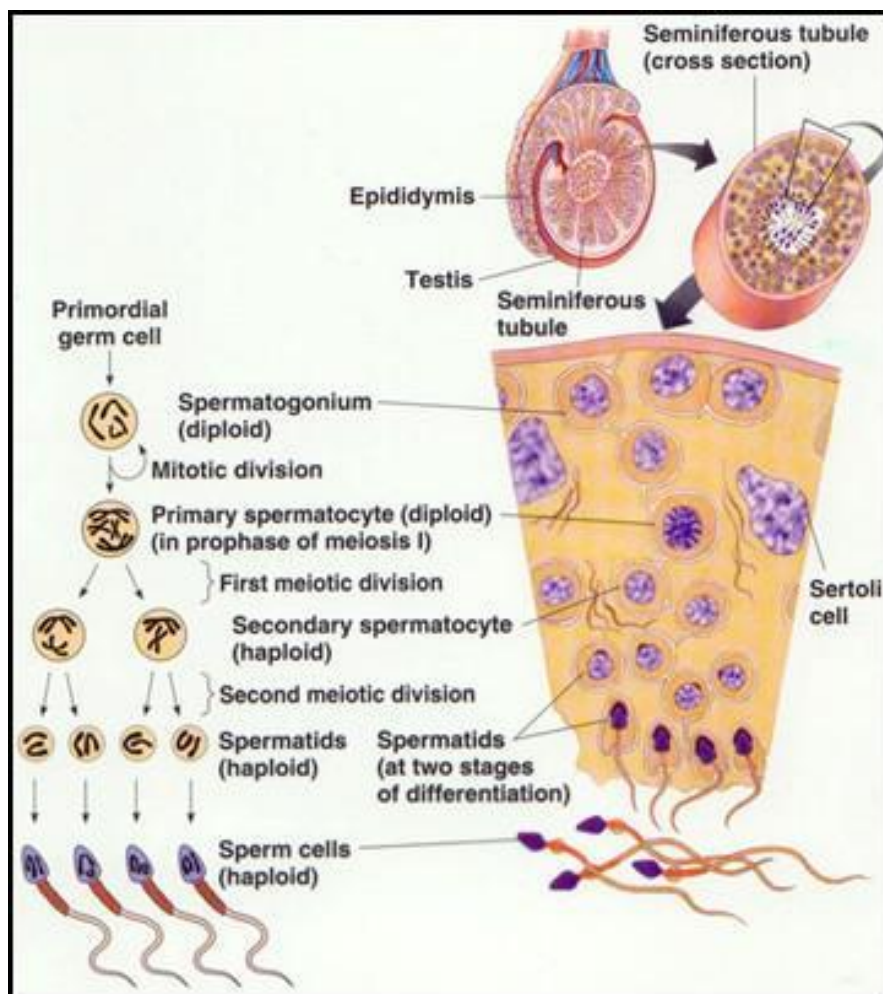
Prenatální vývoj spermatogeneze je zastaven v premeiotickém stadiu. V pubertě dochází k nastartování spermatogeneze diferenciací a znovuvytvořením Leydigových buněk.

V prenatální fázi putují primordiální pohlavní buňky ze žloutkového váčku cestou dorsálního mesenteria k základům pohlavních žláz, vcestují do základu budoucího varlete a stávají se součástí provazců (v 10. týdnu mají podobu vlásečkových klíčků, kruhovitěho nebo oválného průřezu a jsou složeny z podpůrných buněk a gonocytů) připojených do rene testis. Prepubertální gonocyty se diferencují ve spermatogonie A0, které představují kmenovou buňku spermatogonií. Vývoj zárodečných buněk probíhá v kanálcích směrem od obvodu do centra; na periférii jsou spermatogonie, centrálněji postupně spermatocyty I. a II. řádu a spermatidy.

Spermatogenezi dělíme na fázi mitotickou, meiotickou a spermiogenezi.

1. **Mitotická fáze** zahrnuje proliferaci a obnovování spermatogonií a jejím výsledkem jsou preleptotenní spermatocyty I.
2. **Meiotická fáze** je velmi komplexním procesem změn na chromozomové a molekulární úrovni.
3. **Spermiogeneze** je diferenciační fáze, kdy mužská gameta dostává svoji konečnou podobu a je uvolněna ze tkáňového svazku gonády; tento proces se nazývá spermiace (nespadá již do prenatálního vývoje spermií).

Postnatální vývojový cyklus spermatogeneze trvá přibližně 64 dní a dá se rozdělit na čtyři fáze: A, mitóza spermatogonií, trvající asi 16 dní, při níž vzniká primární spermatocyt, B, první meióza o délce asi 24 dní a výsledkem je sekundární spermatocyt, C, druhá meióza – jedná se o nejkratší část, trvající jen hodiny, kdy vzniká spermatida a D, spermiogeneze trvající asi 24 dní, při níž vzniká spermie (obr. 5). Zrání spermií se dokončuje při transportu nadvarletem (8 – 17 dní).

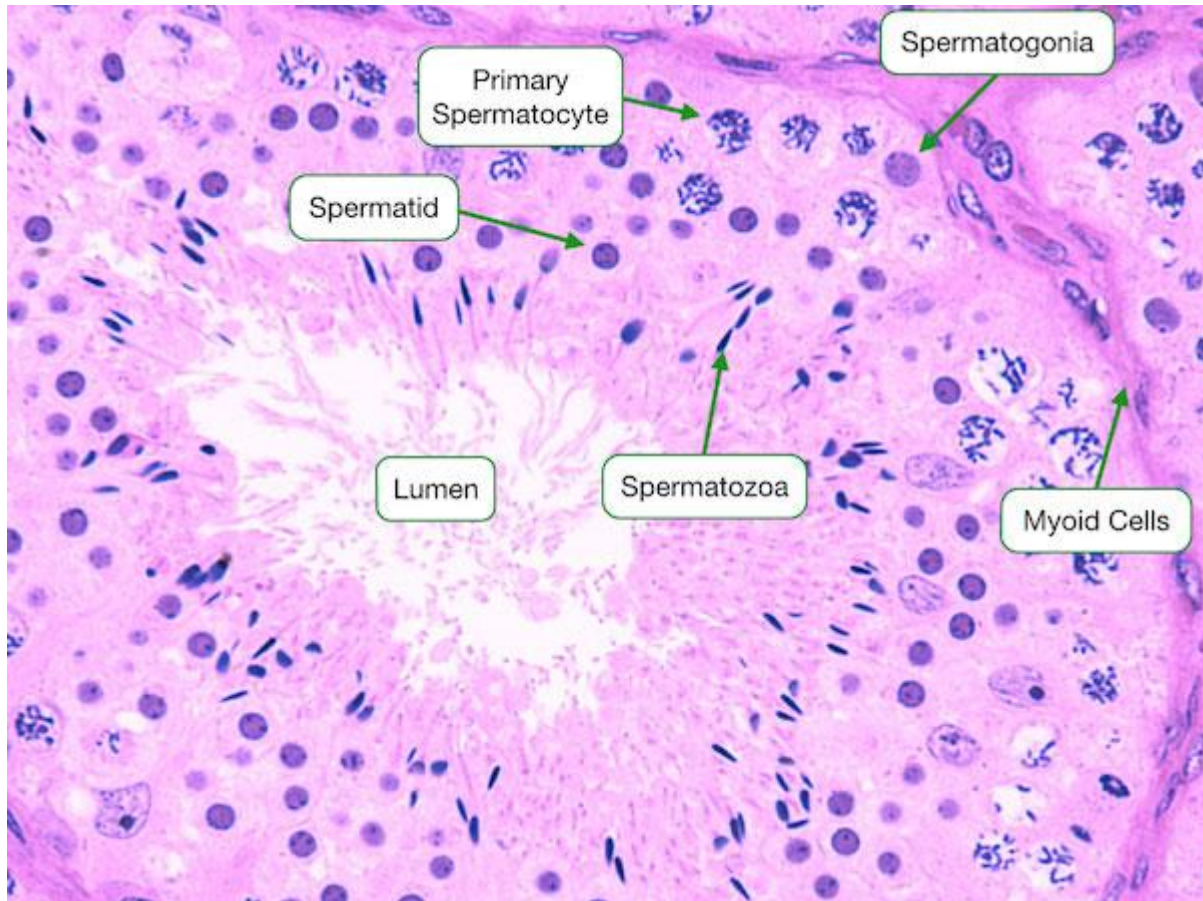


Obrázek 5 Schéma spermatogeneze a spermogeneze (zdroj. <http://slideplayer.cz/slide/3340846/>)

Spermatogonie mají silně barvitelné jádro a málo cytoplazmy. Dělením spermatogonií A0 vznikají spermatogonie A1 a jejich dělením pak spermatogonie A2 (A1 a A2 jsou spící spermatogonie). V průběhu čtyř mitotických dělení vznikne ze spermatogonie A3 celkem 16 spermatocytů I. řádu. Pro spermatogonie je typické uložení na bazální lamině zárodečného epitelu (obr. 6).

Ze spermatogonií při mitóze vzniknou spermatocyty I, již bez kontaktu s bazální membránou. Spermatocyty I mají diploidní sadu chromosomů ( $2n$ ) a po zdvojení DNA v S-fázi přecházejí do meiotické profáze I, při níž dojde k párování homologních chromosomů otcovského a mateřského původu a vznikají synaptonemální komplexy. Ve stadiu pachytene dochází ke „crossing over“, kdy se vymění úseky mezi homologními chromozomy.

Dělením spermatocyty I vznikají dva menší spermatocyty II, z nichž každý má jednu sadu chromozomů, a po krátké interfázi nastává bez replikace DNA druhé meiotické dělení, které probíhá jako normální mitóza.



Obrázek 6 Uložení jednotlivých stádií vývoje spermií ve varleti.  
[http://medcell.med.yale.edu/histology/testis\\_sperm\\_development.php](http://medcell.med.yale.edu/histology/testis_sperm_development.php)

Spermatidy jsou nejmenší buňky, z nichž vznikají spermie. Během této přeměny spermatidy na spermii dochází ke kondenzaci jádra, tvorbě akrozomu, vývoji bičíku, rejekci cytoplazmy, atd. Nezbytným procesem při formování hlavičky spermie je sbalení DNA na velikost asi 10 % objemu jádra somatické buňky. Kondenzace jádra je navozena postupným nahrazováním různých subtypů histonů za protaminy (Braun 2001, Meistrich *et al.* 2003, Hogarth *et al.* 2005). Na nahrazení histonů protaminy během spermiogeneze se podílí histon H1FNT, který je nezbytný pro tvorbu jádra ve spermii (Tanaka *et al.* 2006). Toto nahrazení vede ke kompletnímu uzavření transkripce v jádře a umožňuje jádru předpokládanou skoro krystalickou strukturu. Kolem 85 % DNA spermie je spojeno s protaminy, což jsou malé, vysoce bazické proteiny bohaté na arginin a cystein. Pozitivně nabitě aminokyseliny vytvářejí s paternální DNA a cysteiny vysoce kondenzovaný komplex a formují disulfidické můstky

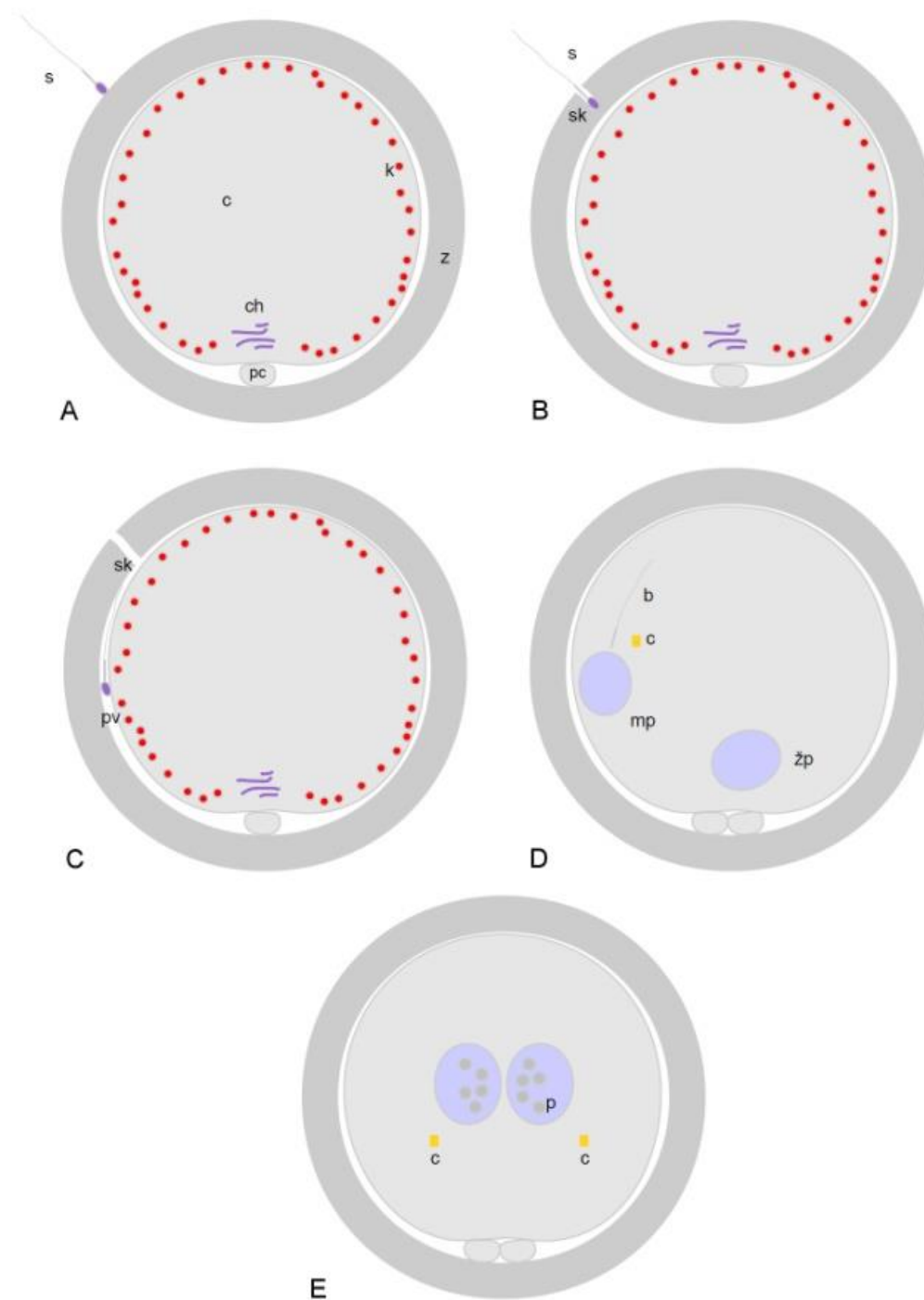
mezi sousedními molekulami protaminů (Oliva 2006). DNA spermie je asi šestkrát více kondenzovaná než mitotické chromozomy (Fuentes-Mascorro *et al.* 2000). Na konci diferenciaci se spermatida v zárodečném epitelu přemění ve spermii (spermiace). Ke zdárnému průběhu spermiogeneze je nezbytná vysoká koncentrace testosteronu z Leydigových buněk.

U pohlavně dospělého muže každou hodinu opouští varle asi 1 milion spermií. Vývoj zralé spermie z kmenové spermatogonie trvá asi 72 až 91 dní, po ejakulaci je spermie za optimálních podmínek přizpůsobená k pohybu schopna aktivně proniknout cervikálním hlenem přes dělohu do vejcovodů a fertilizovat oocyt.

## 1.2 Oplození a časný vývoj embrya

Časný vývoj embrya začíná oplozením oocyту spermii a končí před implantací embrya. Kapacitovaná spermie se naváže na receptory ZP oocyту. Akrozom je velmi důležitý při průniku spermie do oocyту v M II. Jedná se o vazbu povrchových proteinových receptorů spermie s glykoproteiny ZP3, která umožní spermii přilnout k zona pellucida a je kritickým krokem oplození oocyту. Je spuštěna akrozomální reakce, dochází k exocytóze akrozomálního váčku a k hydrolyze ZP v těsné blízkosti spermie. Aktivní pohyb spermie, který je převážně záležitostí tlakové síly (Trávník 2017), je poté nezbytný pro průnik spermie přes zona pellucida, a pro dosažení kontaktu s membránou oocyту (Kim *et al.* 2008, Kozlovsky *et al.* 2013, Jones *et al.* 2014). Následně dochází k splynutí membrány oocyту a membrány spermie a struktury spermie se dostávají do cytoplazmy oocyту (obr. 7).

Splynutím membrán se spojí cytoplazma spermie a oocyту, což je podmínkou dalšího vývoje. Působením fosfolipázy C z cytoplazmy spermie dojde k aktivaci oocyту koncentračními oscilacemi  $Ca^{2+}$ , dojde k depolarizaci cytoplazmatické membrány oocyту, která zabrání dočasně dalším spermii, aby splynuly s membránou oocyту. Poté následuje kortikální reakce: dojde k exocytóze kortikálních granul do perivitellinního prostoru, což má za následek zona hardening. Tím je zabráněno průniku dalších spermií do oocyту. Následně je obnovena polarizace membrány oocytu a je dokončena meióza, oddělení druhého pólového tělíska a vzniká mateřské prvojádro (obr. 8). Ze spermie zůstává v oplozeném oocytu pouze jádro, centriol a obsah perinukleární theky, zatímco mitochondrie otcovského původu jsou ubikvitinovány a tak jsou označeny k likvidaci (formou aktivní autofagie). Zbylé buněčné struktury jsou autofagicky odbourány. Jádro spermie projde procesem dekondezace, je obnoven jaderný obal a dochází k náhradě protaminů ve chromatinu za histony.



Obrázek 7 Oplození lidského oocytu

A – oocyt je v metafázi II, blízko metafázových chromozomů (ch) leží mezi zonou (z) první pólocyt (pc), v cytoplasmě (c) oocytu leží pod buněčnou membránou vrstva kortikálních granul (k). Spermie (s) je navázána na zónu; B – spermie (s) proniká zónou pomocí akrozomálních enzymů a mechanické síly vytvářené bičíkem a vytváří v ní kanálek (sk); C – spermie pronikla do perivitellinního prostoru (pv); D – spermie byla internalizována do cytoplazmy oocytu, oddělil se bičík (b) a proximální centriol (c) a hlavička spermie se transformuje v mužské prvojádro (mp). Z cytoplazmy vymizela kortikální granula, která se vylila do perivitellinního prostoru, vydělil se druhý pólocyt a formuje se ženské prvojádro (zp); E – prvojádra (p) doputovala do centra cytoplazmy, obsahují několik prenukeolů. Proximální centriol (c) se rozdělil na dva dcerinné, z nichž se budou formovat centrozomy zygoty. (podle Trávníka 2018)



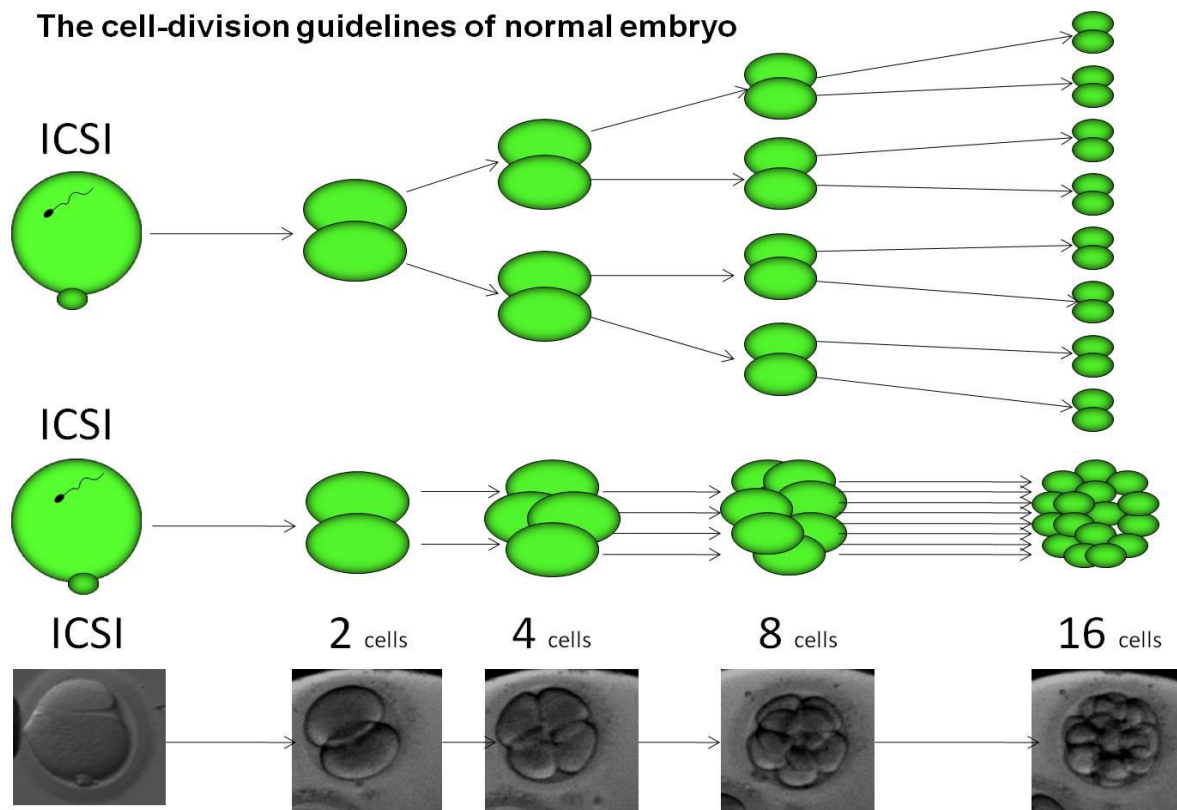
Obrázek 8 Oplozená zygota (prvojádro) s prvojádry a prvním a druhým pólovým tělískem (foto Zbořilová).

Nezastupitelnou roli v embryu má spermatický centriol, který umožní buněčné dělení. Spermie vnáší do oocytu haploidní počet autosomálních chromozomů a jeden pohlavní chromozom (X nebo Y), čímž určí pohlaví vznikajícího embrya. Oocyt přináší rovněž haploidní počet chromozomů a chromozom X, dále pak cytoplazmu a zásobu ribonukleových kyselin na počáteční vývoj embrya (do 72 h); zásadní organelou jsou i mitochondrie, které jsou v embryu vždy jen mateřského původu. Před započítím prvního dělení dojde k rozpadu jaderného obalu obou prvojader, z kondenzují chromozomy a k prvnímu mitotickému dělení dochází asi 22 hodin po oplození oocytu. Vzniká stadium dvou buněk, další mitózou čtyř buněk, osmi buněk, šestnácti buněk, moruly a následně blastocysty (obr. 9).

První tři dny vývoje lidských embryí nedochází k transkripci, všechny procesy probíhají na základě látek (ribonukleové kyseliny, enzymy, proteiny) nahromaděných v oocytu v průběhu oogeneze. Po tomto období následuje aktivace embryonálního genomu. Zásadní roli zde hrají geny ze skupiny paired homeobox genů, které jsou exprimovány právě jen ve fázi neimplantačního vývoje embrya. Embryonální genom se aktivuje ve 4. až 5. buněčném cyklu embrya (Hlinka 2017, Wong *et al.* 2010). Do 120 hodin vývoje proběhne



těchto cyklů 9. Postupně dochází ve vlnách k degradaci mateřské ribonukleové kyseliny a mateřských proteinů.



Obrázek 9 Normální dělení embrya od oplození do 96 hodin vývoje (podle Hlinky 2017).

*In vivo* vývoj lidského embrya probíhá od oplození až po čtyřbuněčné stádium ve vejcovodu, který embryo opouští vstupem do děložní dutiny v 8 až 16 buněčném stádiu (Croxatto *et al.* 1979, Ashary *et al.* 2018). V děloze se vyvíjí až do implantace, která probíhá po uvolnění blastocysty ze zona pellucida.

### 1.3 *In vitro* fertilizace

Při laboratorním oplození a kultivaci *in vitro* se snažíme maximálně napodobit prostředí *in vivo*, kde na vznikající embryo působí stabilní prostředí s přísunem živin, odváděním metabolitů, stabilní osmolarita, parciální tlak kyslíku i CO<sub>2</sub> a navíc vliv růstových faktorů, cytokinů a hormonů. V přirozeném prostředí se embryo i tekutina, v níž se vyvíjí, neustále pohybuje vlivem peristaltických vln a kmitů řasinek. Pohyb má značný význam pro udržování stálé koncentrace látek v bezprostředním okolí embrya, protože pohyb molekul prostou difuzí vytváří nepříznivý koncentrační spád a je relativně pomalý (Trávník 2018). Úspěšnost metod

oplození *in vitro* je proto závislá na přesném dodržování pracovních postupů v čistém prostředí s omezením negativních vlivů v průběhu celého procesu.

O vývoj celého oboru asistované reprodukce (AR) se velmi významně zasloužil Robert Edwards, který za svůj celoživotní přínos vědě obdržel roku 2010 Nobelovu cenu za fyziologii. Svými úspěšnými experimenty (Edwards a *et al.* 1969) se zasloužil o porod prvního dítěte po fertilizaci *in vitro* (Steptoe a Edwards, 1981).

Diagnostika i léčba neplodnosti je problematikou interdisciplinární, často vyvolávající četné etické, právní a sociální kontroverze spojené s prováděním těchto metod. Do diskuzí se zapojuje i náboženství, které v mnoha částech světa podstatně ovlivňuje postoje společnosti k AR. K hlavním otázkám, které vyvolávají etická dilemata, patří etický status embrya, zahrnutí třetí strany („třetího rodiče“) do reprodukčního procesu darováním genetického materiálu, náhradní mateřství, kryokonzervace lidského embrya, výzkum na embryích, použití embryonálních kmenových buněk, redukce vícečetných těhotenství či mikromanipulační techniky. Podle kvalifikovaných odhadů se ročně ve světě provádí přibližně 1,5 milionu cyklů IVF, z nichž se narodí asi 350 tisíc dětí (ESHRE 2014). Mikromanipulační techniky představují jeden z nejvýznamnějších laboratorních pokroků v AR (Palermo *et al.* 1992). Jejich provádění je podmíněno dostupností mikromanipulačního zařízení a je náročné i na technickou a odbornou přípravu personálu.

Nejúspěšnější metoda v asistované reprodukci, intracytoplazmatická inseminace (ICSI), spočívá ve vložení jedné životaschopné spermie pomocí zaostřené kapiláry o průměru kolem 7  $\mu\text{m}$  do zralého oocyty, který je takto oplozen. Při narušení cytoplazmatické membrány spermie, se uvolní do cytoplazmy oocyty SOAF, tím dojde k aktivaci oocyty a může dojít k jeho fertilizaci (Yong *et al.* 2003). Spermie je vybírána zkušeným embryologem nejčastěji podle její morfologické kvality a pohyblivosti. Vybraná spermie je následně znehybněna, nasáta do mikroinjekční pipety a injektována do cytoplazmy oocyty. ICSI řeší poruchy průniku spermie do vaječné buňky. Existují varianty ICSI, které napomáhají optimálnímu výběru spermie, např. selekce morfologicky nejoptimálnější spermie (IMSI) či výběr zralé spermie (PICSI). ICSI je nezbytné při použití spermií získaných chirurgicky technikami TESA/TESE (Testicular Sperm Aspiration /Extraction), MESA/ MESE (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration/ Extraction) či PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration).

Na ústupu je asistovaný hatching (AH) spočívající v rozrušení obalu vyvíjejícího se časného embrya před jeho zavedením do dutiny děložní. Oplození oocyty a časný vývoj embrya probíhá v původním obalu oocyty, v němž se vytvoří otvor, kterým může vyvíjející se

embryo ve stadiu blastocysty tento obal opustit a uhnízdit se v sekrečně změněné sliznici dělohy.

Délka kultivace embryí *in vitro* je individuální, protože je ovlivněna kvalitou gamet, kvalitou vyvíjejících se embryí, rychlostí jejich rýhování a v neposlední řadě také přáním pacientky. Prodloužená kultivace je metoda umožňující kultivovat embrya až 120 hodin od odběru oocytů. Výsledky ukazují na vyšší úspěšnost prodloužené kultivace u pacientek s vyšším počtem embryí, což je nejspíše podmíněno možností širšího výběru (Glujovsky *et al.* 2018, Wang *et al.* 2010, Thum *et al.* 2010).

Úspěšnost otěhotnění závisí i na počtu přenášených embryí, ale s jejich vyšším počtem se významně zvyšuje riziko vícečetného těhotenství. Optimální počet transferovaných embryí je doporučen lékařem s ohledem na věk, počet předchozích IVF cyklů a kvalitu embryí, záleží však i na přání pacientky. Nejčastěji se dnes transferuje jedno embryo.

## **1.4 Výběr embryí, systémy hodnocení v jednotlivých stádiích vývoje**

Pro úspěšnost AR je velmi důležitý výběr kvalitního embrya pro embryotransfer, proto je zavedeno několik hodnotících systémů, které významně pomáhají ve výběru embrya pro embryotransfer nebo pro kryokonzervaci. Nutností je průběžné sledování základních indikátorů kvality embrya i zpětné vyhodnocování úspěšnosti otěhotnění ve vztahu ke zvoleným technikám, použitému materiálu i personálu.

### **1.4.1 Kontinuální monitoring vývoje embryí**

Trendem posledních let je transfer jednoho embrya, aby se zabránilo vícečetnému těhotenství. Pečlivému výběru embrya napomáhá metoda time-lapse (TL), založená na pořizování snímků jednotlivých embryí v přesných časových intervalech k detailnímu posouzení dynamiky a synchronizace časného buněčného dělení embrya. Doba světelné expozice se pohybuje kolem 0,5 sekundy. V tomto systému jsou zachovány standardní kultivační podmínky, nedochází ke kolísání teploty, pH, koncentrace oxidu uhličitého ani vlhkosti. Embrya jsou celou dobu umístěna v kultivačním prostředí a neopouštějí inkubátor. Dokumentační systém umožňuje pořizování všech fotografií přímo v prostředí inkubátoru. Tím se minimalizuje stres a nepříznivé vlivy působící na kultivovaná embrya. Nutností bylo vyvinutí nových jednokrokových médií, která se nemění po celou dobu kultivace, aby byly zachovány stabilní kultivační podmínky. Jejich nevýhodou je ale hromadění odpadních látek v kultivačním médiu.

Existují dva hlavní celosvětově používané systémy pro kontinuální monitoring embryí. První je součástí speciálního kultivačního inkubátoru – např. EmbryoScope (Vitrolife, Švédsko), Miri (ESCO, Dánsko), Geri (Austrálie), nebo se jedná o speciální kamery, které se umísťují do běžného kultivačního inkubátoru – např. Primo Vision (Vitrolife, Švédsko) a Eeva (Merck, Německo). K fotografování systémy využívají digitální invertovaný mikroskop, vytvořené snímky jsou pak přenášeny do počítače, kde jsou i vyhodnocovány. Nejčastěji používány jsou systémy Primo Vision (obr. 10) a EmbryoScope (obr. 11).

Primo Vision se skládá z digitálního invertovaného mikroskopu vybaveného Hoffmanovým kontrastem. Kamery se vkládají do jednotlivých polic v inkubátoru a na jeden počítač může být připojeno až šest kamer (jedna kamera je na jednu pacientku pro 9 – 16 embryí, podle použité kultivační misky, obr. 12) Při pořizování fotografií je používáno zelené monochromatické světlo o vlnové délce 590 nm, které je bezpečné pro kultivovaná embrya.

EmbryoScope je přímo inkubátor se zabudovanou kamerou a mikroskopem s Hoffmanovým kontrastem. Použité světlo je červené světlo o vlnové délce 635 nm. Kultivační misky jsou až na 12 (u novějšího typu na 16) embryí.



Obrázek 10 Kamera ke kontinuálnímu monitoringu Primo Vision, umístění kamer v inkubátoru



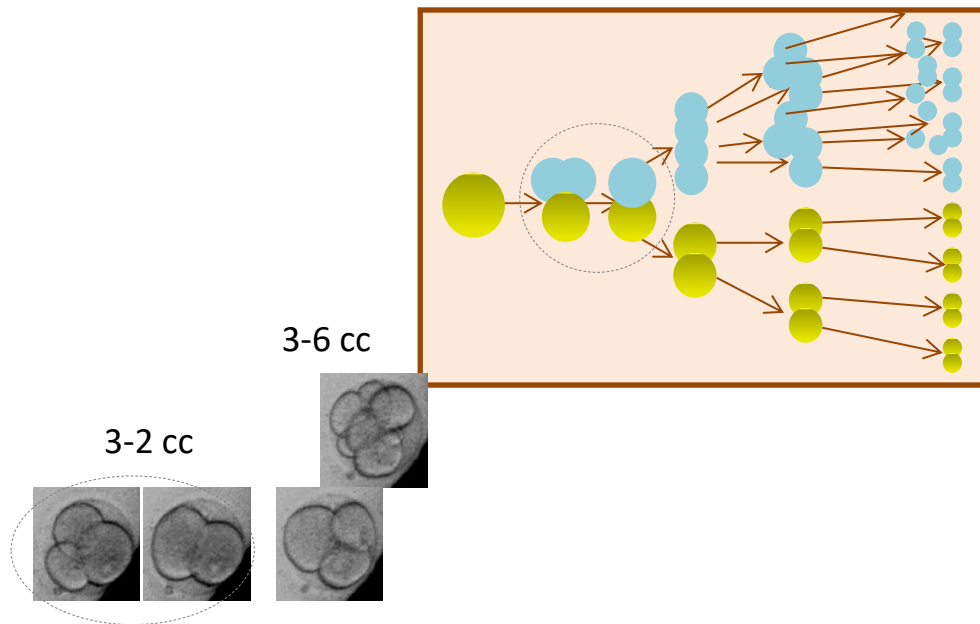
Obrázek 11 Kultivační systém EmbryoScope



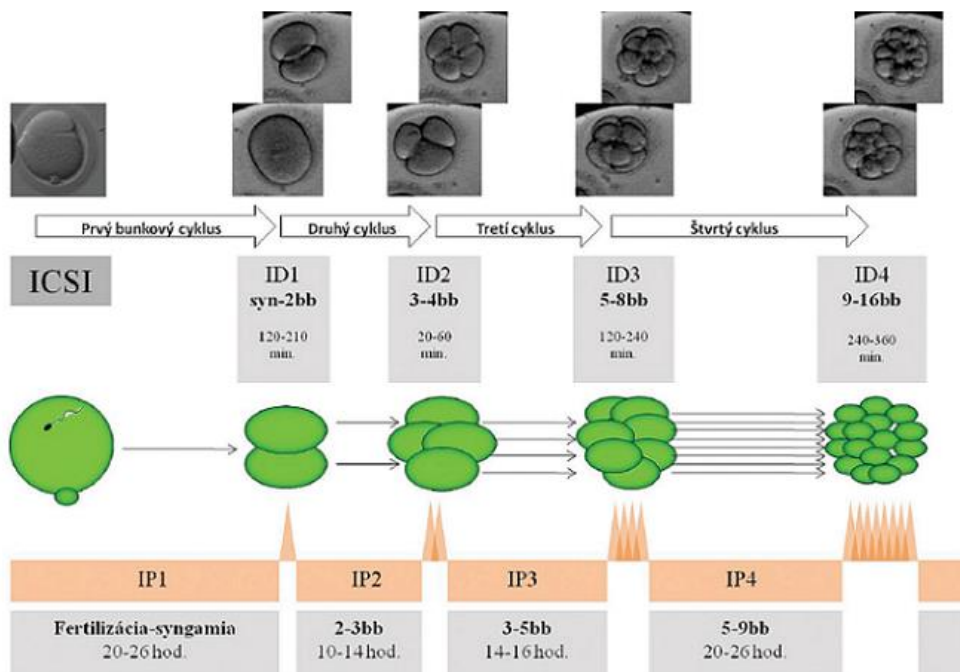
Obrázek 12 Speciální kultivační miska pro time-lapse systém Primo Vision

Cílem je výběr embrya podle dynamiky růstu a načasování jednotlivých fází buněčného dělení (Hlinka *et al.* 2012, Lemmen *et al.* 2008, Meseguer *et al.* 2011 a Wong *et al.* 2010).

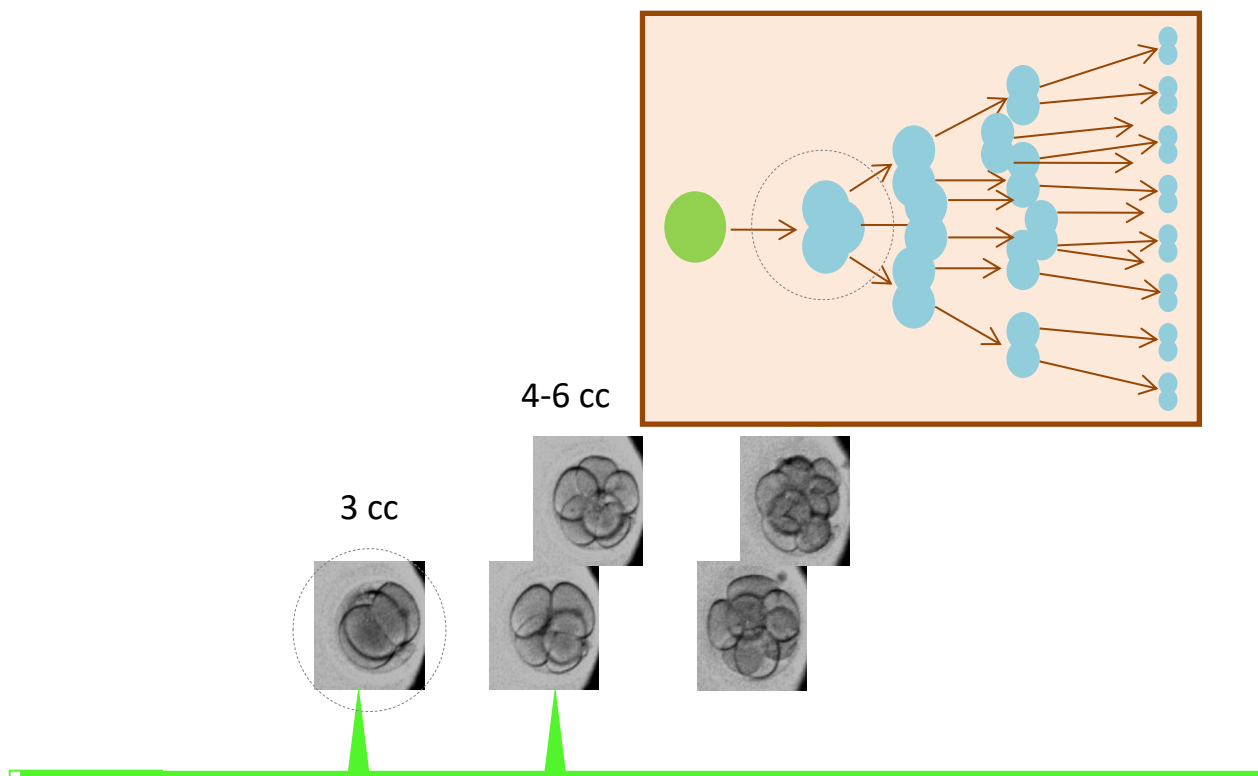
Variabilita embryí u jedné pacientky je často vysoká. Embrya, která při stacionárním hodnocení vypadají morfologicky shodně, se mohou lišit kinetikou buněčného dělení.



Obrázek 13 Schéma mitotické poruchy zaznamenané při kontinuálním monitoringu - embryonální mozaicismus. Poměr euploidních (zeleně) a aneuploidních (modře - abnormální dělení a následná fúze blastomer) buněk můžeme stanovit metodami preimplantačních genetických technik. Chromozomální aneuploidie vynikají jako následek poruchy dělení časného embrya. Ztráta nebo získání chromozomů během mitotického dělení neovlivňuje ploidii všech buněk embrya (dle Hlinky 2015)



Obrázek 14 Schematické znázornění časového průběhu a definování prvních 4 buněčných cyklů u lidských embryí, jejichž vývoj vedl ke vzniku klinického těhotenství. (Hlinka et al. 2012)



Obrázek 15 Schéma mitotické poruchy zaznamenané při kontinuálním monitoringu - plně aneuploidní embryo po abnormálním prvním dělení. Můžeme potvrdit metodami preimplantačních genetických technik (Hlinka 2015).

Pravidelnost a rychlost dělení embrya úzce souvisí s jeho viabilitou. Pro posouzení kvality časného embrya je nejdůležitější první cytokineze, doba mezi první a druhou mitózou a doba mezi druhou a třetí mitózou (Wong *et al.* 2010). Pravidelné dělení buněk bývá odrazem správného počtu chromozomů a genetické informace v nich obsažené (obr. 13). Vitální embrya (obr 14) se dělí v přesně vymezených a v každé mitóze velmi synchronních časových intervalech (Kiessling 2010, Wong *et al.* 2010, Hlinka *et al.* 2012).

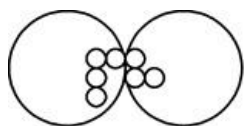
Pokud z prvojader vznikne rovnou třibuněčné embryo, mělo by být vždy vyloučeno, protože jde o embryo aneuploidní (obr. 15). Díky kontinuálnímu monitoringu můžeme odhalit poruchy dělení, a taková embrya mohou být včas vyřazena. Pacientkám s nepravidelným dělením se doporučují metody preimplantačních genetických technik (PGT). U pacientů s rizikem monogenních onemocnění je doporučeno provádět PGT. Úspěšnost IVF je do značné míry závislá na kvalitě přenášeného embrya. Time-lapse hodnocení je objektivní a pomáhá při volbě embrya s dobrou prognózou implantace.

## 1.4.2 Individuální hodnocení embryí

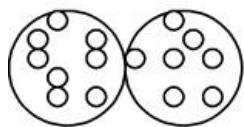
Snaha vybrat embryo s dobrou perspektivou dalšího vývoje (fenotypově i genotypově zdravé) provází AR od počátku. Základní metodou je statické nebo kontinuální mikroskopické hodnocení jejich morfologie. Objevily se i snahy o metabolickou analýzu kvality embryí, které jsou v běžné praxi velmi obtížně aplikovatelné, protože koncentrace metabolitů se pohybuje řádově v pikomolech. Hodnocení nesmí ovlivnit viabilitu embrya, musí být objektivní, rychlé a přesné. Při statické morfologii hodnotíme: A, pronukleární stadium, B, stadium rýhování a C, stadium blastocysty.

Pronukleární stadium (PN) vzniká po oplození nejprve formováním mužského prvojádra z hlavičky spermie a poté ženského prvojádra z mateřské sady chromozomů. Prvojádra jsou přítomna v oocytu až do doby prvního rýhovacího dělení. V prvojádrech proběhne S-fáze, kdy se zdvojnásobí množství deoxyribonukleové kyseliny a těsně před prvním rýhovacím dělením se zformují v obou prvojádrech chromozomy. Obaly prvojader se rozpadnou a dvojice homologních chromozomů mateřského a otcovského původu vytvoří páry, čímž je zahájeno první mitotické dělení. PN stadium poprvé popsal Payene (Payne *et al.* 1997), následující studie prokázaly vliv pronukleární morfologie na další vývoj lidského embrya (Scott and Smith 1998, Tesarik and Greco 1999). Hodnocení pronukleárního stadia provádíme 18-19 hodin po oplození. Lepší vývojový potenciál mají embrya, kde není rozdíl v počtu pronukleolů v obou prvojádrech větší než tři a všechny pronukleoly v obou prvojádrech jsou buď polarizované nebo nepolarizované s úhlem osy prvojader vůči úhlu osy procházející vzdálenějším pólocytem je menší než 50 stupňů (obr. 16).

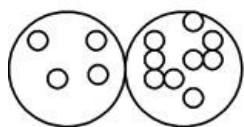




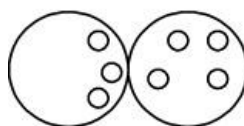
**P0** NPBs in both PN polarized when NPBs [3,7], and non-polarized if NPBs  $\geq 7$ .



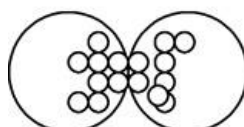
**P1**  $>3$  NPBs of difference between pronuclei.



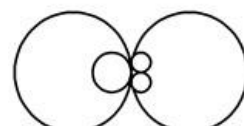
**P2**  $< 7$  NPBs, without polarization in at least one PN.



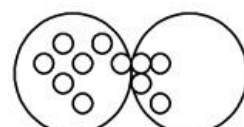
**P3**  $>7$  NPBs, polarized in at least one PN.



**P4**  $< 3$  NPBs in at least one PN.



**P5** one PN polarized and one PN non-polarized.



Obrázek 16 Klasifikace PN (podle Tesařika *et al.* 1999)

Po nástupu dělení (25 – 26 hodin po oplození) hodnotíme stadium časného rýhování (early cleavage), kdy v ideálním případě nacházíme dvoubuněčné embryo. Přenos embryí, která byla vybírána na základě rychlosti nástupu prvního buněčného dělení, vedl k signifikantně vyššímu procentu otěhotnění v řadě publikovaných prací (Andonov *et al.* 2003, Bos-Mikich *et al.* 2001, Demircan *et al.* 2002, Lundin *et al.* 2001, Mooney *et al.* 2001, Sakkas *et al.* 2001, Shoukir *et al.* 1997).

Při hodnocení dvoubuněčných embryí bychom se dle doporučení ESHRE měli zabývat kontrolou počtu jader v blastomerech a to 27 hodin  $\pm$  1 hodina po oplození (ALPHA – ESHRE 2011, Ergin *et al.* 2014). Vícejaderné blastomery druhý den vývoje lidského embrya nemají vliv na vývoj blastocysty (Desai *et al.* 2014), ale byl prokázán nepříznivý vliv na implantaci i pravděpodobnost porodu dítěte (Ambroggio *et al.* 2011, Hardarson *et al.* 2001, Fauque *et al.* 2013, Van Royen *et al.* 2003). Proto je důležité zaměřit se i na multinukleacie, tedy vícejaderné buňky (obr. 17).

Druhý den po oplození má embryo 4 blastomery, třetí den 8 blastomer, nejméně však 7 blastomer (Gardner and Balaban 2016). Nejčastěji používané hodnocení dle Gardnera *et al.* (2012) je uvedeno v tab. 2, důležité je rovněž procento fragmentace v embryu (tab. 3), kvalitní embryo obsahuje méně než 20 % fragmentů. Pomocí elektronové mikroskopie bylo prokázáno, že se ve fragmentech nejčastěji vyskytují mitochondrie spolu s Golgiho aparátem, primárními lysosomy a vakuolami (Yu *et al.* 2018).

Tabulka 2 Hodnocení embryí dle Gardnera

Doba hodnocení od oplození (h)	Hodnocení
18 - 19	Symetrická prvojádra, v obou je stejný počet pronukleolů, osa prvojader svírá malý úhel s osou procházející pólocytem a středem cytoplasmy
25 - 26	Dvoubuněčné embryo
42 - 44	Čtyřbuněčné embryo, bez polyjaderných blastomer, fragmentace do 20%
106 - 108	Vytvořen blastocél, embryoblast kompaktní z četných buněk, trofoblast tvoří souvislý epitel

Tabulka 3 Hodnocení fragmentace embryí

Procento fragmentů	Stupeň hodnocení (kvalita embrya)
0	A
10 - 20	B
20 - 40	C
nad 50	D

A,



B,



C,



Obrázek 17 Hodnocení jader v blastomerech: A, monojaderné blastomery, B, monojaderné i multijaderné blastomery, C, multijaderné blastomery

Největší vývojový potenciál mají embrya, která dosáhnou stadia blastocysty. U těchto embryí hodnotíme nejčastěji podle Gardnera a Schoolcrafta (Gardner and Schoolcraft 1999, Gardner *et al.* 2004) embryoblast (A – velký počet těsně naléhajících buněk, B – volnější seskupení a/nebo menší množství buněk, C – velmi malé množství buněk) a trofoblast (A – velký počet buněk, tvořící souvislý epitel, B – volnější seskupení s menším množstvím buněk, C – málo velkých buněk). Další studie uvádějí větší význam kvality trofoblastu než embryoblastu na implantaci a porod dítěte jak u čerstvých, tak i zamražených embryí (Ahlstrom *et al.* 2011, Honnma *et al.* 2012, Hill *et al.* 2013, Ebner *et al.* 2016).

## 1.5 Faktory ovlivňující časný vývoj embrya

Vývoj embrya je ovlivněn laboratorním a kultivačním prostředím, které zajišťují potřebné podmínky pro jejich vývoj. U kultivačního média hrají kritickou roli teplota, pH a koncentrace kyslíku. Vystavení embrya některé suboptimální komponentě kultivačního systému zvyšuje jeho citlivost k ostatním stresovým faktorům. Vliv mají všechny kritické materiály (misky, pipety, zkumavky), které přicházejí do styku s buňkami, proto je požadováno testování na možnou embryotoxicitu (Holyoak *et al.* 1996) a certifikáty CE IVF (nezávislé ověření posouzení shody výrobku s požadavky příslušných nařízení vlády, které provádí výrobce pro přístroje a materiál používaný v IVF). Nezanedbatelný vliv na fenotyp a viabilitu embrya má kvalita gamet, ze kterých embrya pocházejí.

Kultivace lidských embryí vyžaduje přítomnost vysoké koncentrace bikarbonátů, a proto média obsahují pufr založený na rovnováze koncentrace oxidu uhličitého a bikarbonátů (Trávník 2018). Požadovaná koncentrace oxidu uhličitého se pohybuje mezi 5 a 7 % v atmosféře inkubátoru, která při běžném tlaku vytvoří s bikarbonátem pufr o pH 7,2 – 7,4 (Wale and Gardner 2015).

Pufrovací vlastnosti média jsou nejdůležitější ihned po aktivaci vývoje, kdy embryo nemá několik hodin schopnost regulovat pH. Koncentraci oxidu uhličitého volíme podle konkrétního ekvilibrovaného média a podle nadmořské výšky konkrétní laboratoře, protože vliv oxidu uhličitého závisí i na parciálním tlaku. Pro krátkodobé udržení pH je vhodný pufr založený na HEPES (sodná sůl kyseliny hydroxyethylpiperazinetansulfonové), který nemá toxický vliv na buňky a je vhodný k manipulaci mimo inkubátor (Mahadevan *et al.* 1986, Dale *et al.* 1998, Hentemann *et al.* 2011, Will *et al.* 2011, Gardner and Lane 2007, Swain and Pool 2009). V poslední době je věnována pozornost i hladině kyslíku při kultivaci. Jeho obsah v atmosféře je kolem 20 %, avšak ve tkáních se pohybuje kolem 5 % (Meintjes 2012). Vyšší koncentrace kyslíku vede ke zvýšení hladiny koncentrace aktivních kyslíkových radikálů, proto se dnes považuje za optimální 5% koncentrace kyslíku. Snížení koncentrace kyslíku v inkubátoru se dosahuje přidáváním dusíku (Boone *et al.* 1999, Khoudja *et al.* 2013). Kvalita plynné směsi může být ovlivněna příměsí cizích látek, které mohou mít negativní vliv na kultivaci, proto je nutné používat plyny v co nejvyšší kvalitě, ideálně medicínské (Boone *et al.* 1999, Khoudja *et al.* 2013, Wale and Gardner 2015).

Optimální kultivační teplota se pohybuje kolem 37 stupňů Celsia (Fawzy *et al.* 2018, Sun *et al.* 2004). Pro embrya je kritické zvýšení teploty k 38 stupňům Celsia. Nižší teploty (kolem 36 stupňů Celsia) snižují pravděpodobnost vývinu embrya do stadia blastocysty

(Fawzy *et al.* 2018). Při manipulaci s miskami mimo inkubátor se využívá překrytí média parafinovým olejem, který zabrání nechtěnému odparu a zároveň stabilizuje teplotu i pH média. Zároveň při manipulaci mimo inkubátor využíváme kalibrované vyhřívané plochy, které nám zpomalují chladnutí misek.

Hlavní složkou kultivačních medií je hydrogenkarbonátový pufr, protože metabolismus savčího vajíčka i spermie je závislý na hydrogenkarbonátovém iontu (Mahadevan *et al.* 1986, Okamura *et al.* 1986, Wale *et al.* 2012). Média dále obsahují kationty a anionty v koncentraci obdobné jako v krevním séru. U ostatních iontů jsou možné poměrně značné variace v koncentraci bez vlivu na výsledek kultivace (Quinn *et al.* 1985). Další součástí kultivačních medií jsou sodíkové, draslíkové, vápenaté a hořečnaté kationty, které zajišťují membránový potenciál a podílejí se na transportní funkci a osmotické rovnováze. Vápenaté ionty mají nezastupitelnou úlohu při aktivaci oocyty. Z aniontů v médiích dominuje sulfát, fosfát a bikarbonát.

Nastavení správné osmolarity je velmi důležité (osmotické koncentrace asi 280 mmol/l). Nejvyšší roli v udržení osmolarity mají sodíkové a chloridové ionty. Zvýšení osmotické koncentrace je kritické, protože může vést k zastavení vývoje embryí (Edwards 1973, Baltz 2012, Baltz 2001).

Hlavními energetickými zdroji v kultivačních médiích je pyruvát, laktát a od doby kompaktace embrya i glukóza. Glukóza je přítomna i jako zdroj energie pro spermie (Lorange *et al.* 1986, Miki 2007). Nejčastější makromolekulou v médiu je albumin, dnes se používá rekombinační lidský albumin, který je pro vyvíjející se embryo bezpečnější. Pro růst embryí *in vitro* je dostatečná koncentrace 10 g/l (Trávník *et al.* 1987). Esenciální i neesenciální aminokyseliny v médiích pomáhají udržovat osmolaritu v cytoplazmě embrya, dále působí jako pufr, antioxidanty, zdroje energie, biosyntetické prekursory a regulátory energetického metabolismu. Z praktického hlediska jsou přidávána antibiotika, obvykle gentamycin, který není pro časná embrya toxický (Gardner and Lane 2007). Často používanou složkou kultivačních medií je fenolsulfonftalein (fenolová červeň), který slouží jako indikátor pH. Při požadovaném pH (7,2 -7,4) má lososovou barvu, při zvýšení pH médium zčervená, až zfialoví (nedostatečné nasycení média oxidem uhličitým) a při snížení pH je oranžový (vysoká koncentrace oxidu uhličitého anebo možná kontaminace mikroorganismy). Součástí některých kultivačních medií jsou i růstové faktory a vitamíny.

Oocyty, spermie a časná embrya mohou být poškozeny toxickými látkami organického i anorganického původu už v nepatrných koncentracích (Brinster a Cross 1972, Holland a White 1980, Hall *et al.* 1998, Khoudja *et al.* 2013, Merton *et al.* 2007). Silně negativní

úlohu mohou sehrávat přítomné endotoxiny z bakteriální kontaminace (Snyman a Van Der Merwe 1986).

## 1.6 Faktory ovlivňující implantaci, MZT, DZT

Implantace embrya je zahájena v okamžiku, kdy blastocysta opustí zona pellucida. V tuto dobu by se blastocysta měla za fyziologických podmínek nacházet v dutině děložní. Transport embrya do dělohy je ovlivněn řadou faktorů včetně peristaltických pohybů vejcovodů, které estrogeny stimulují a progesteron tlumí. Embryo do dělohy obvykle vstupuje za 60 - 69 hodin po ovulaci ve stadiu moruly. Většinou (ve dvou třetinách případů) dojde k implantaci do endometria zadní stěny děložního fundu a těla a to obvykle uprostřed. Trofoblast a syncytiotrofoblast embrya secernuje choriový gonadotropin (hCG), který je v mateřském séru zjištělý již 8. den po koncepci (Bergh *et al.* 1999, Poikkeus *et al.* 2001) a podněcuje tvorbu progesteronu a estradiolu ve žlutém tělisku. HCG je vhodným biochemickým markerem k první detekci těhotenství. Léčba neplodnosti je pro léčený pár velmi psychicky zatěžující, zejména po transferu embryí (ET) s očekáváním výsledku hCG testu a následně pak potvrzení klinické prosperující gravidity ultrazvukem (UZ). I proto narůstá snaha o co nejčasnější rozlišení vitálního těhotenství od těhotenství s nepříznivým výsledkem, a to na základě vyhodnocení hladiny hCG (Zbořilová *et al.* 2018, Brady *et al.* 2013, Hauzman *et al.* 2006, Ioannidis *et al.* 2005, Kim *et al.* 2012, Singh *et al.* 2013). Průměrné hodnoty hCG jsou nižší u neprospívajících těhotenství (biochemická gravidita, mimoděložní těhotenství nebo abort) a naopak vyšší u vícečetných gravidit.

Implantace je ovlivněna kvalitou embrya, komunikací embrya s endometriem a kvalitou endometria. Při určování příčin poruchy implantace při neplodnosti, opakovaných časných potratech a selhávání IVF pátráme po anatomických, hormonálních, infekčních (zánětlivých), toxických a imunologických faktorech. Důvody periimplantačních těhotenských ztrát jsou až ze 75 % genetické (Popescu *et al.* 2018). Jedná se o chromozomální vady a to buď o aneuploidie (meiotické nebo mitotické) nebo přestavby chromozomů, které vznikají buď *de novo* (zejména u spermií) nebo jsou vrozené. Geneticky podmíněná může být i neschopnost embrya implantovat (Shahine and Caughey 2005).

Další důvody mohou být endokrinní, prezentující se nedostatečnou sekrecí progesteronu nebo estradiolu, nedostatečná odpověď endometria, relaxin či endogenní kanabinoidy. Endogenní kanabinoidy jsou produkovány dělohou či embryem, nezávisle anebo častěji pod vlivem steroidních hormonů. Nízké dávky působící přes CB1 (cannabinoid receptor type 1) v trofoblastu aktivují signální dráhu ERK (Extracellular regulated-signal

kinase, extracelulárně regulovaná kináza), která vede k přípravám na implantaci blastocysty. Na druhé straně vysoká koncentrace AEA (N-arachidonoylethanolamid) inhibuje aktivitu  $Ca^{2+}$  kanálů a blastocysta dále setrvává v dormantním stavu (Wang *et al.* 2003).

Hormonální poruchy jsou většinou dobře léčitelné. Častým důvodem selhání implantace je i imunologický faktor. Tolerance ze strany mateřské imunity hraje důležitou roli při přežívání embrya v děloze placentálních savců, vynikla po odhalení klonálně-selekčního principu funkce imunity a upozornil na ni již roku 1953 Medawar (Medawar *et al.* 1953). Nesprávně regulovaná imunita na fetomaternálním rozhraní má valný podíl nejen na opakovaných časných potratech, ale i na selhání embryotransferu (Kučera *et al.* 2005, Madar *et al.* 2003, Mor *et al.* 2011).

Při poruchách implantace embrya je velmi důležité v největší možné míře vyléčit genitální záněty, které mohou chronicky stimulovat lokální slizniční imunitu. Mezi nebezpečné mikroorganismy patří: mykoplazmata, ureaplazmata, toxoplazmata, trichomonády, chlamydie, bakterie (listerie), některé viry (CMV, EBV, rubeola, virus chřipky, spalničky, herpetické viry, parvoviry B19); i běžné mykózy se však mohou podílet na patologické aktivaci lokální imunity v ženském genitálu (Nouza *et al.* 2006).

V laboratoři můžeme implantaci embrya ovlivnit nejen výběrem vhodného embrya, ale i použitím hyaluronanu (HA) v kultivačním médiu použitým před samotným embryotransferem. Hyaluronan je přirozeně se vyskytující makromolekula z rodiny glykosaminoglykanů, je bohatě zastoupen v tělních tekutinách a extracelulární matrix (Salustri *et al.* 1999). HA je také hlavním glykosaminoglykanem v sekretu dutiny děložní a vejcovodů. Bylo prokázáno, že zvyšuje adhezi typu buňka - buňka a buňka - extracelulární matrix, tedy i apozici a adhezi blastocysty v procesu implantace (Salustri *et al.* 1999, Turley *et al.* 1984, Yanagishita 1994). Byla prokázána signifikantně se zvyšující biosyntéza HA v embryu v době implantace s poklesem jeho produkce hned následující den a to u myších (Carson *et al.* 1987) i lidských embryí (Schoolcraft *et al.* 2002) Apozice a adheze hrají skutečně významnou roli v zahájení implantace. I proto jsou komerčně dostupná sekvenční média obohacována o různé složky s cílem zvýšit implantaci. Takovou složkou jsou např. proteiny (nejčastěji albumin) nebo nověji také hyaluronan (HA). Firma Vitrolife, Švédsko přidává HA do svých kultivačních médií. Zatímco standardní single step kultivační médium G-TL, které se používá ke kultivaci embryí od fertilizace až do stadia blastocysty, obsahuje vyšší koncentrace humánního sérového albuminu (5 mg/ml) a nižší koncentrace HA (0,125 mg/ml), u média EmbryoGlue (EG) je situace opačná. Médium obsahuje pouze 2,5 mg/ml rekombinantního humánního albuminu, ale 0,5 mg/ml HA. EG obsahující

hydrogenuhličitanový pufr, humánní sérový albumin, hyaluronan a gentamicin jako antibakteriální látku. Navíc je EG obohaceno i o esenciální mastné kyseliny, zatímco G-TL médium obsahuje pouze neesenciální mastné kyseliny a také EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), která u média EG zcela chybí (Singh 2015, Vitrolife manuál <http://www.vitrolife.com/Documents/Product%20manuals/Manual%20G-Series%20INTL%20v9-2.pdf>). SAGE1-step médium obsahuje EDTA, humánní sérový albumin (5 mg/ml), mastné kyseliny, Gentamycin (0,01 mg/ml) a také HA v koncentraci 0,1 mg/ml (Origio manuál [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf13/K133707.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/K133707.pdf)).

Asistovaná reprodukce přináší riziko vícečetných gravidit, což představuje významnou porodnickou komplikaci, a ohrožuje zdraví i životy plodů i matky. Toto riziko stoupá zejména při přenosu dvou a více embryí. Nejčastěji se jedná o dvouvaječná dvojčata (DZT), ale bez rizika není, co do četnosti těhotenství, ani přenos jednoho embrya, protože přenesené embryo se může rozdělit za vzniku jednovaječných dvojčat (MZT). Monozygotní dvojčata se vyskytují asi v 0,4 % gravidit počatých přirozeným způsobem. Podle doby rozdělení pak mohou MZT být zcela samostatné nebo mohou mít společné chorion nebo chorion i amnion. Velkým rizikem může být i propojení placentárního oběhu plodů se vznikem tzv. twin-to-twin transfúze. Studie ukazují nejméně dvou až trojnásobný nárůst výskytu jednovaječných dvojčat po metodách asistované reprodukce ve srovnání se spontánním početím (Bulmer *et al.* 1970, Derom *et al.* 1987, Sills *et al.* 2000, Schachter *et al.* 2001, Milki *et al.* 2003, Mateizel *et al.* 2016, Hviid *et al.* 2018). V závislosti na době rozdělení embryí diagnostikujeme: bichoriální-biamniální, monochoriální-biamniální nebo monochoriální-monoamniální dvojčata (Bulmer *et al.* 1970, Abusheikha *et al.* 2000). Velmi málo je známo o mechanismech podílejících se na zvýšeném výskytu MZT ve skupině pacientů léčených metodami asistované reprodukce. Některé možné příčiny byly zkoumány, včetně ovariální indukce (Derom *et al.* 1987), mikromanipulačních technik (Sills *et al.* 2000, Alikani *et al.* 1994, Skiadas *et al.* 2008, Vitthala *et al.* 2009), délky kultivace (Milki *et al.* 2003, Da Costa *et al.* 2001, Cassuto *et al.* 2003, Wright *et al.* 2004), věku pacientů (Abusheikha *et al.* 2000, Cohen *et al.* 1992, Alikany *et al.* 2003) a glukosy (Moley *et al.* 1998, Menezo *et al.* 2002). Žádné obecné shody o příčině vzniku MZT nebylo zatím dosaženo (Schachter *et al.* 2001, Knopman *et al.* 2010). Jednovaječná dvojčata mají vyšší riziko placentárních poruch prokrvení (Talbert *et al.* 1996), pupečnickových komplikací (Nyberg *et al.* 1984) a vývojových anomálií (Schinzel *et al.* 1997, Hall 2003). Úmrtnost je vždy vyšší u MZT, než u jednočetného těhotenství (Fowler *et al.* 1984), což klade naléhavou potřebu identifikovat základní faktory ovlivňující tento jev. Vliv genetického faktoru na vznik MZT byl popřen (Bulmer *et al.* 1970) nebo považován za



nevýznamný (Aston *et al.* 2008), ale existují práce, které popisují vysoký výskyt MZT v celých rodinách (Harvey *et al.* 1977, Lichtenstein *et al.* 1996, Hamamy *et al.* 2004). V naší práci z roku 2015 (Sobek *et al.* 2015) výsledky naznačují vliv dědičných faktorů na vznik MZT, který je posílený metodami asistované reprodukce u pacientek s nadprůměrnou funkcí vaječnicků. Ke snížení výskytu MZT je vhodný sběr informací o rodinné anamnéze MZT před vlastním procesem stimulace tak, aby se mohl provádět elektivní přenos jednoho embrya u žen s vynikající funkcí vaječnicků a pozitivní rodinnou anamnézou MZT. Je na individuálním zvážení, zda je vhodné takové ženy vybírat jako dárkyně oocytů.

## 2 CÍL

1. Ověření přínosu transferového média EG na implantaci embryí v porovnání se standardními one-step médii G-TL (Vitrolife, Švédsko) a SAGE 1- step (Origio, Dánsko) a dále posouzení možného vlivu na těhotenské ztráty v programu asistované reprodukce.

2. Ověření přínosu metody kontinuálního monitoringu použitím time-lapse systému Primo Vision. Posouzení vlivu výběru optimálního embrya k embryotransferu porovnáním výsledků ET embryí vybraných dle standardního morfologického statického hodnocení a metodou kontinuálního monitorování.

### **3 MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1 Ovariální stimulace, odběr oocytů a kultivace embryí**

##### **1.1. Ovariální stimulace, odběr a fertilizace oocytů**

Do studie bylo zařazeno 484 pacientek podstupujících IVF + ET v období od 1. 6. 2015 do 31. 12. 2017 na pracovišti Fertimed, s. r. o., Olomouc, pacientky byly nastimulovány řízenou hyperstimulací. Podle způsobu stimulace byly pacientky rozděleny do tří skupin. Dlouhý agonistický protokol (lagon) byl použit u 45 %, krátký agonistický (sagon) u 53 % a antagonistický protokol (santa) u 2 %. Při stimulaci byl aplikován folitropin  $\alpha$  nebo  $\beta$  v průměrné denní dávce 200 IU (průměrná spotřeba 2250 IU), ovulace byla indukována hCG v dávce 5-10.000 IU 34-36 hodin před odběrem oocytů, který probíhal transvaginálně pod kontrolou ultrazvuku. Způsob řízené hyperstimulace a načasování indukce ovulace zásadně ovlivňují nejen množství a kvalitu získaných oocytů, ale i receptivitu endometria, které reaguje na endogenní hladiny estradiolu a progesteronu.

Ihned po odběru byly oocyty očištěny enzymaticky pomocí hyaluronidázy a dočištěny mechanicky pomocí Synga pipet (Eppendorf). K oplození zralých oocytů v metafázi II došlo vždy za dvě až pět hodin po odběru oocytů metodou ICSI.

#### **3.2 Kultivační média a misky**

Po mikroinjekci byly oocyty inkubovány v 20 - 50  $\mu$ l média pod minerálním olejem (Ovoil, Vitrolife) v buď v kultivačních miskách Micro-droplet dish (Vitrolife) nebo při použití Primo Vision v Micro well group culture dish (Vitrolife).

Kultivace proběhla v kultivačním inkubátoru při teplotě 37° C a s 5% syčením CO<sub>2</sub>. Ke kultivaci byla u 38 % pacientek použita jednokroková média firmy Sage (SAGE1-Step medium, USA) nebo v 62% Vitrolife (G-TL Vitrolife médium, Švédsko). U skupiny s použitím EmbryoGlue média byla embrya ekvilibrována před vlastním ET v tomto médiu v 20 – 60 minut a poté byla v tomto médiu (asi 20  $\mu$ l) přenesena do dělohy. Embrya z kontrolní skupiny byla kultivována a transferována v kultivačním médiu (Sage, Vitrolife) a přenesena za stejných podmínek do dělohy, ale v kultivačním médiu Sage nebo Vitrolife.

### 3.3 Selekcce embryí a embryotransfer

Kontrola oplození oocytů byla provedena vždy za 16 - 18 hodin po provedení ICSI. Normální fertilizace byla potvrzena přítomností dvou rozlišitelných prvojader a pólových tělísek buď v inverzním mikroskopu nebo v počítačovém systému Primo Vision. Kontrola rýhování embryí byla prováděna každý den od oplození až po embryotransfer. U sledovaných pacientek byla embrya transferována po 48 (21 %), 72 (32 %), 96 (20 %) a 120 hodinách kultivace (27 %) v závislosti na rozhodnutí pacientky. K embryotransferu byl u všech pacientek použit transferový katetr TDT SET (CCD, Francie). Hodnocení kvality embryí bylo provedeno naším standardně používaným systémem hodnocení kvality. Hodnotili jsme počet buněk v embryu a procento fragmentace: (a) do 10 %, (b) 10–20 %, (c) 20–50 % a (d) fragmentace nad 50 % obsahu embrya. Za kvalitní embrya byla považována embrya s maximálně 20% podílem fragmentů a odpovídajícím počtem blastomer dnu vývoje. Naše zkušenosti ukazují, že odpovídající počet blastomer je nejdůležitějším selekčním kritériem při výběru embryí k přenosu do dělohy. Třetí den vývoje kvalitní embryo muselo mít 7 – 8 buněk, embrya s nižším počtem blastomer mají menší šanci na implantaci (Boostanfar *et al.* 2001, Langley *et al.* 2001, Check *et al.* 2001, Yu *et al.* 2018, Chen *et al.* 2006, Racowsky *et al.* 2009). Skórování blastocyst proběhlo systémem Gardnera a Schoolcrafta (Gardner and Schoolcraft 1999, Gardner *et al.* 2007).

V případě monitoringu byla požadována ještě správná dynamika vývoje a pravidelnost dělení.

### 3.4 Těhotenství

Za klinickou graviditu bylo označeno těhotenství, u kterých byl ultrazvukem prokázán gestační váček s přítomnou nebo nepřítomnou akcí srdeční. Biochemické gravidity nebyly do studie zahrnuty. Určení těhotenství probíhalo obvykle 10 – 16 dní po embryotransferu pomocí stanovení hCG a následně bylo potvrzeno ultrazvukovým vyšetřením.

### 3.5 Transferové médium EmbryoGlue

Soubor pacientek byl rozdělen na dvě skupiny. Celkem se jednalo o 349 pacientek, u nichž bylo při přenosu embryí použito transferové médium EG. Kontrolní skupinu tvořilo 135

pacientek, u kterých bylo použito kultivační médium (SAGE 1-Step 54% nebo G-TLVitrolife médium 46%).

### **3.6 Kontinuální monitoring**

Stejný soubor pacientek jako při hodnocení vlivu EG (484) byl rozdělen na dvě skupiny. Jednalo se o 247 pacientek, jejichž embrya byla kultivována v time-lapse systému Primo Vision a před embryotransferem byla navíc ještě posouzena dynamika dělení. Kontrolní skupinu tvořilo 227 pacientek, jejichž embrya byla kultivována standardním kultivačním systémem.

### **3.7 Statistická analýza**

Vliv EG na pravděpodobnost otěhotnění byl analyzován pomocí generalizovaných lineárních modelů (GLM) v programu R (R Core Team, 2017). K výběru nejlepšího modelu byla použita metoda multimodelové inference (Burnham a Anderson 2002), která jako selekční kritérium používá Akaikeho informační kritérium (AIC). Nejlepší model byl vyhledán metodou backward and forward stepwise selection pomocí funkce step.

Vliv monitoringu a kontroly kvality vývoje embryí na pravděpodobnost otěhotnění byl analyzován na stejném souboru pacientek rovněž pomocí GLM s binomickým rozdělením chyby a logitovou link function. Jako prediktory byly použity dvě kategorické proměnné: monitoring (ano/ne) a kvalita vývoje (ano/ne). Vzájemné kombinace těchto dvou faktorů vedly ke vzniku 5 modelů, z nichž byl vybrán nejvíce podporovaný model pomocí nejnižší hodnoty AIC.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Porovnání EmbryoGlue a klasického kultivačního média

U vstupních parametrů (např. věk pacientek, počet získaných a oplozených oocytů, počet embryí) obou souborů nebyl zjištěn významný rozdíl (tab. 4).

Tabulka 4 Srovnání pacientek – vstupní parametry skupiny EmbryoGlue

Srovnávaný parametr	EG	Kontrolní skupina
Počet cyklu	349	135
Věk	33,8	33,62
Získ oocytů	9,67	9,6
Počet embryí/ET	1,23	1,19
Počet zamražených embryí/pacientku	1,3	1,57
Počet oplozovaných oocytů/pacientku	8,5	8,6
Fertilizace/pacientku	5,3	5,7
P v den hCG (nmol/l)	3,2	3,8

Jako další vysvětlující proměnné byl použitý věk pacientek, stimulační protokol, výška endometria, použité kultivační médium, počet získaných oocytů, procento fertilizovaných oocytů, délka kultivace, počet přenesených embryí a počet konzervovaných embryí. Pravděpodobnost vzniku těhotenství i těhotenských ztrát jsou binární proměnné, proto byla data analyzována pomocí GLM s binomickou distribucí chyby a logitovou link function. Proměnné věk, výška endometria, počet konzervovaných embryí, počet získaných oocytů, procento fertilizovaných oocytů, počet přenesených embryí a délka kultivace (48, 72, 96, 120 h) byly považovány za kvantitativní proměnné. Proměnné EG (ano/ne), kultivační médium (sage/ska) a stimulace (lagon/sagon/sant) byly považovány za kvalitativní (kategorické) proměnné. Kompletní data všech 11 proměnných byla získána od 429 pacientek. V případě pravděpodobnosti abortu byly získány kompletní údaje pro 80 pacientek. Nejdříve byly testovány účinky jednotlivých proměnných pomocí modelů s jedním prediktorem. Poté byl hledán kombinovaný model, který má největší podporu v datech.

V modelech s jedním prediktorem (tab. 5) bylo prokázáno, že pravděpodobnost otěhotnění rostla s délkou kultivace, s počtem konzervovaných embryí a po stimulaci dlouhým protokolem s GnRH agonisty (čím nižší je hodnota AIC, tím větší má daný model podporu v datech. Silnou podporu naznačuje rozdíl v AIC větší než 2). Pravděpodobnost otěhotnění naopak klesala s věkem pacientky a s rostoucím počtem transferovaných embryí.

U ostatních proměnných byla podpora malá. Z kombinovaných modelů získaly největší podporu 4 modely, které vždy obsahovaly věk, dobu kultivace a typ použité stimulace (tab. 6). Je tedy zřejmé, že tyto 3 proměnné EG významně ovlivňují pravděpodobnost otěhotnění. Ve 3 ze 4 nejlepších modelů byla zastoupena také proměnná EG, což může naznačovat jistý slabší pozitivní efekt aplikace EG (tab. 6). Nejlepší model předpovídá, že pacientce při použití EG stoupá pravděpodobnost otěhotnění průměrně o 9 % (délka kultivace 48h o 5,4 %, 72 h o 7,4 %, 96 h o 9,2 %, 120h o 9,8 %), vs. pacientky bez EG (tab. 7). Vliv věku je však mnohem výraznější, proto doporučujeme otěhotnět včas (obr. 18).

Tabulka 5 Podpora modelů s jedním prediktorem ve srovnání s modelem jen s interceptem, který neobsahoval prediktor

Proměnná	AIC	Rozdíl proti modelu s interceptem
Model s interceptem	537,9	0
Doba kultivace	505,9	32,0
Věk pacientky	512,9	25,0
Kryo	520,3	17,6
Stimulace	532,5	5,4
Počet ET	534,8	3,1
Počet oocytů	536,0	1,9
Proporce fertálních oocytů	537,1	0,8
EG	537,6	0,3
Endometrium	539,5	-1,6
Kultivační medium	539,9	-2,0

Tabulka 6 Struktura kombinovaných modelů, jejichž AIC se od nejlepšího modelu lišilo o méně než 2

Struktura modelu	AIC
věk + doba kult + stimul + EG + počet oocytů	480.29
věk + doba kult + stimul + EG	480.37
věk + doba kult + stimul	480.56
věk + doba kult + stimul + EG + počet oocytů + kryo	481.25

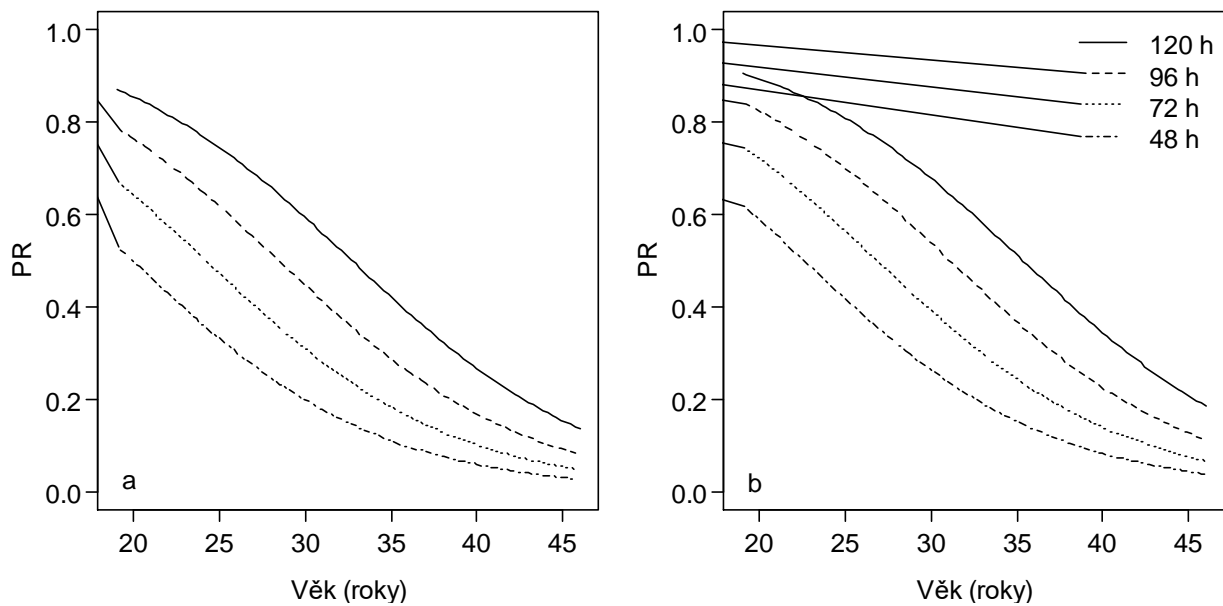
Tabulka 7 Závislost PR na době kultivace a použití EG

Doba kultivace	PR EG (%)	PR kontrolní skupina (%)
48 hodin	19	13,6
72 hodin	29,2	21,8
96 hodin	42,3	33,1
120 hodin	56,6	46,8

Z uvedené analýzy vyplývá, že jistá slabší podpora pro modely s EG existuje, neboť nejlepší modely pravidelně obsahují použité EG při ET. Potvrdilo se však, že mnohem větší vliv na

pravděpodobnost vzniku těhotenství má věk, délka kultivace a typ použité stimulace. Pacienti s EG měli větší pravděpodobnost otěhotnění.

Analýza pravděpodobnosti těhotenských ztrát ukázala, že z modelů s jedním prediktorem získal významnější podporu (rozdíl v AIC proti modelu bez prediktoru = 2,8) pouze model obsahující proporci fertilizovaných vajíček. Jinak řečeno čím více oplozených vajíček, tím je menší pravděpodobnost těhotenských ztrát. Ani kombinované modely nezískaly větší podporu než tento model.



Obrázek 18 Závislost pravděpodobnosti otěhotnění na věku, době kultivace a aplikaci EG u pacientek bez EG (a) a s EG (b), jak ji předpovídá nejlepší model pro pacientky stimulované lagon a s průměrným počtem oocytů.



## 4.2 Výsledky porovnání Primo Vision a klasické kultivace

U vstupních parametrů (např. věk pacientek, počet získaných a oplozených oocytů, počet embryí) obou souborů nebyl zjištěn významný rozdíl (tab. 8).

Tabulka 5 Porovnání pacientek – vstupní parametry soubor kontinuální monitoring

Srovnávaný parametr	Kontinuální monitoring	Kontrolní skupina
Počet cyklu	257	227
Věk	33,7	33,72
Zisk oocytů	9,67	9,6
Počet embryí/ET	1,18	1,24
Počet zamražených embryí/pacientku	1,5	1,4
Počet oplozovaných oocytů/pacientku	8,5	8,6
Fertilizace/pacientku	5,5	5,5
P v den hCG (nmol/l)	3,3	3,6

Jako prediktory byly použity dvě kategorické proměnné: monitoring (ano/ne) a kvalita vývoje (ano/ne). Kombinacemi těchto faktorů vzniklo 5 modelů, z nichž byl vybrán nejvíce podporovaný model pomocí nejnižší hodnoty AIC (tab. 9).

Tabulka 6 Podpora jednotlivých modelů vysvětlujících vliv kontroly kvality vývoje a monitoringu na pravděpodobnost otěhotnění podle AIC.

Struktura modelu	AIC
kvalita vývoje + monitoring + monitoring*kvalita vývoje	519.69
kvalita vývoje + monitoring	520.16
kvalita vývoje	520.90
Monitoring	539.71
pouze intercept	543.20

Na základě nejlepšího modelu (kvalita vývoje, monitoring a interakce monitoringu s kvalitou vývoje) bylo prokázáno, že pravděpodobnost otěhotnění byla významně vyšší u pacientek time-lapse s dobrým vývojem embryí, než u klasického morfologického hodnocení embryí s dobrou kvalitou (43,1 %, vs. 31,7 %). Při transferu nekvalitních embryí, kde byl přenos proveden na žádost pacientky, byla naopak úspěšnost nižší, než u pouze morfologického hodnocení (10 %, vs. 15,9 %), tab. 10.

Tabulka 7 Pravděpodobnost otěhotnění (pregnancy rate) jednotlivých skupin pacientek (95% meze spolehlivosti), rozdělených na základě kultivace a kvality transferovaného embrya předpovězené modelem, který obsahoval kvalitu vývoje, monitoring a interakci monitoring\*kvalita vývoje

Proměnná	Počet pacientek	Pregnancy rate (%)
Kvalitní embryo vybrané po time-lapse PV	211	43,1 (36,1– 50,3)
Embryo se špatnou dynamikou vývoje po time-lapse PV	46	10,0 (3,8–2,4)
Kvalitní embryo vybrané dle morfologie	156	31,7 (24,4–39,9)
Embryo nesplňující morfologická kritéria na hodnocení dobré embrya	71	15,9 (4,2–14,7)

Analýza pravděpodobnosti těhotenských ztrát ukázala (tab. 11) významně vyšší pravděpodobnost těhotenských ztrát u embryí, která nesplňovala morfologická kritéria na hodnocení dobré embrya (60 % těhotenských ztrát u obou skupin pacientek se špatnou kvalitou vývoje embryí). Kvalitní embrya vybraná i na základě dynamiky vývoje měla významně nižší procento potratů, než embrya hodnocená jen podle morfologických kritérií (6,6%, vs. 22,5%).

Tabulka 8 Pravděpodobnost abortů jednotlivých skupin pacientek, rozdělených na základě kultivace a kvality transferovaného embrya předpovězené modelem, který obsahoval kvalitu vývoje, monitoring a interakci monitoring\*kvalita vývoje

Proměnná	Počet těhotenství	Aborty (%)
Kvalitní embryo vybrané po time-lapse PV	90	6,6
Embryo se špatnou dynamikou vývoje po time-lapse PV	5	60
Kvalitní embryo vybrané dle morfologie	49	22,5
Embryo nesplňující morfologická kritéria na hodnocení dobré embrya	10	60

## 5 DISKUSE

### 5.1 Porovnání EmbryoGlue a klasického kultivačního média

Médium EmbryoGlue (Vitrolife, Švédsko) je určeno k transferu lidských embryí, obsahuje vyšší koncentraci HA a nižší koncentraci albuminů, než je běžné v kultivačních médiích. V den implantace se produkce hyaluronanu v embryu výrazně zvyšuje, což koreluje s přeměnou buněk endometriálního stromatu v buňky deciduální a následující den produkce rychle klesá (Carson *et al.* 1987). Je známo, že HA se účastní fyziologických procesů, jako je embryonální vývoj, migrace, adheze, proliferace a diferenciací buněk. Vlivem hyaluronanu stoupá adheze typu buňka-buňka a buňka-extracelulární matrix, což významně podporuje proces apozice a adheze blastocysty (Salustri *et al.* 1999, Turley a Moore 1984, Yanagishita 1994). HA také nepřímo podporuje angiogenezi. (Simon *et al.* 2003), tím se zlepšuje apozice a uchycení embrya, což jsou klíčové kroky v procesu implantace.

Počáteční studie vlivu HA na myších embryích prováděl Gardner (Gardner *et al.* 1999), který prokázal signifikantně zvýšenou implantaci embryí při použití hyaluronanu. Při studiu lidských embryí se potvrdilo, že hyaluronan může úspěšně nahradit lidský sérový albumin jako výhradní makromolekulu v médiu používaném při embryotransferu (Svobodova *et al.* 2007), což vedlo k vysokému počtu těhotenství (Gardner *et al.* 1999). Simon (Simon *et al.* 2003) prokázal lepší pregnancy rate (PR) a implantacion rate (IR) při použití média obohaceného HA v porovnání s albuminem, rozdíl nebyl významný a velikost souboru byla malá. Několik dalších studií také prokázalo vyšší míru PR a IR při ET s použitím médií obohacených o HA (Friedler *et al.* 2007, Hambiliki *et al.* 2010, Nakagawa *et al.* 2012, Yanagishita 1994). Schoolcraft (Schoolcraft 2002) popisuje významně vyšší PR (EG 58,9 % vs. G2.2 48,5 %) i IR (EG 29 % vs. G2.2 21,7 %) při použití EG média. Svobodova *et al.* (2007) prokázala vyšší PR ve skupině pacientek od 30 do 38 let při přenosu 2 embryí s použitím média EG (27,7 % vs. 15,3 %).

V této studii byla prokázána v průměrně o 9 % (kultivace 48h 5,4 %, 72 h 7,4 %, 96 h 9,2 %, 120h 9,8 %) vyšší pravděpodobnost vzniku klinické gravidity při použití EG napříč všemi věkovými skupinami při všech délkách kultivace. K podobnému závěru dospěl i Singh (Singh *et al.* 2015), který prokázal zlepšení pravděpodobnosti dosažení klinické gravidity o 7 %. V dalších studiích bylo poukázáno na podobný pozitivní trend vlivu HA obohacených transferových médií na PR (Loutradi *et al.* 2007, Korosec *et al.* 2007, Hazlett *et al.* 2008, Fancsovits *et al.* 2011, Balaban *et al.* 2004, Mahani a Davar 2007, Ravhon *et al.* 2005)

Fancsovits (Fancsovits *et al.* 2015) zaznamenal 3% nárůst PR při používání HA obohaceného média (u 290 pacientek). Většina publikovaných studií nezaznamenala signifikantní rozdíl v nárůstu PR (Simon *et al.* 2003, Friedler *et al.* 2007). Urman (Urman *et al.* 2008) zaznamenal o 15 % vyšší počet vícečetných gravidit při užití médií obohacených o HA. Nepotvrdil se rozdíl v nárůstu počtu vícečetných gravidit. Ve studii jsem shodně s literaturou (Svobodova *et al.* 2007, Bontekoe *et al.* 2014) neprokázala vliv EG média na aborty po asistované reprodukci. Použití média EmbryoGlue je vhodné u všech pacientů podstupujících ET. Vliv věku je však mnohem výraznější, proto by mělo být doporučeno otěhotnět včas (obr. 17).

## 5.2 Porovnání Primo Vision a klasické kultivace

Pro hodnocení kvality embryí je jedním z nejdůležitějších faktorů zkušený a informovaný embryolog, který embrya hodnotí. Hodnocení pouze morfologických parametrů embrya může být velmi subjektivní, doplněním o morfokinetické znaky se částečně sjednotila variabilita mezi jednotlivými embryology a laboratořemi. Při pozorování jevů, které probíhají v řádu minut (dělení buněk) je retrospektivní analýza umožněná použitím time laps záznamů velmi přínosná (Martínez-Granados *et al.* 2017, Ludin *et al.* 2015).

V posledních letech byl vyvinut systém morfokinetického hodnocení *in vitro* kultivovaných embryí tak, aby byl zohledněn jak vývin embrya k časové ose, tak doba trvání jednotlivých buněčných dělení. Průběžný přehled o vývoji embrya umožnilo zavedení inkubačních systémů s kamerami, které byly vyvinuty speciálně pro léčbu IVF (Kirkegaard *et al.* 2015). Přínosem je, ve srovnání s klasickou kultivací, nepřerušování kultivace nutností kontroly vývoje mimo inkubátor, flexibilita v pracovních postupech a vylepšení výběru embryí, založené na předpokladu, že častější pozorování poskytne více informací o embryu, časování jednotlivých dělení a životaschopnosti embrya. Navíc umožňuje neinvazivní retrospektivní rozbor časového záznamu kultivace embryí. Celková dávka expozice embrya světlu při snímání embryí time laps kamerou je menší, než při tradičním morfologickém hodnocení a manipulacích mimo inkubátor, které jsou běžně užívány v klinikách IVF již po celá desetiletí (Wong *et al.* 2010, Ottosen *et al.* 2007, Nakahara *et al.* 2010).

Spolehlivý výběr embryí s nejvyšším vývojovým potenciálem je předpokladem úspěšné léčby IVF. Současné hodnocení embryí je založeno na rychlosti vývoje a morfologických vlastnostech, které jsou mikroskopicky hodnoceny v určitých časových intervalech. Klasifikace embryí se liší mezi různými laboratořemi, většina však hodnotí tyto

fáze vývoje embrya: PN stádium, počet buněk v čase, stupeň fragmentace, přítomnost a počet jader v blastomerách, počet a symetrii blastomer (Hardarson *et al.* 2001, Pickering *et al.* 1995, Racowsky *et al.* 2010, Scott *et al.* 2007, Steer *et al.* 1992, Ziebe *et al.* 1997) a kritické je právě správné načasování doby odečtu embryí (ESHRE/ALPHA 2011). Blastocysty jsou hodnoceny s ohledem na expanzi blastocoelu a počet a soudržnost buněk ve vnitřní buněčné hmotě (ICM) a trofoektodermu (TE) (Gardner *et al.* 2004). Pouze morfologické hodnocení kvality má však při výběru nejvíce viabilního embrya omezenou prediktivní hodnotu (ESHRE/ALPHA 2011).

Výběr embryí založený na morfologickém hodnocení v kombinaci se specifickými časovými intervaly buněčného dělení, získanými pomocí monitoringu vývoje časného embrya, byl v disertační práci potvrzen zvýšením implantace o více než 11% u kvalitního transferovaného embrya (43, %, vs. 32 % embrya bez monitoringu). K podobnému závěru dospěl po přenosu tří denních embryí i Adamson (Adamson *et al.* 2016, 46 % vs. 32,1 %). Siristatidis (Siristatidis *et al.* 2015) dokonce uvádí PR 65,7 % (vs. 39,0 % v případě konvenční kultivace). U pacientek nad 40 let prokázal Siristatidis (Siristatidis *et al.* 2015) ještě větší rozdíl v dosaženém otěhotnění (67 % vs. 20 %), což naznačuje fakt, že embryonální aneuploidie, vznikající se vzrůstajícím věkem matky, mají vliv na dynamiku dělení embryí (Swain 2013, Ottolini *et al.* 2013).

Někteří autoři (Kieslinger *et al.* 2016, Insua *et al.* 2017, Park *et al.* 2015) naopak nepotvrdili přínos kontinuálního monitoringu na zvýšení úspěšnosti léčby (Kieslinger 34, 6 % vs. 34, 3 %). Rozporuplné výsledky byly také publikovány v souvislosti s počtem těhotenských ztrát – např. Park *et al.* 2015 po transferu embryí D2 uvedli vyšší podíl abortů u pacientek s embryí kultivovanými a hodnocenými pomocí TL (33,3 % vs. 10,2 %), naopak Kahraman (Kahrman *et al.* 2013) žádný rozdíl neprokázali (16,6 % time-lapse, 17,3 % konvenční inkubátor), ale popsali nižší podíl biochemických gravidit TL (4 % vs. 11,5 %), což poukazuje na lepší výběr embryí k ET. Ve skupině pacientek, které jsem hodnotila, jsem prokázala výrazně nižší procento těhotenských ztrát po transferu kvalitních embryí vybíraných s pomocí TL, než ve skupině hodnocené jen dle klasické morfologie (6,6 % vs. 22, 5 %), naopak u pacientek s transferem embryí neodpovídajících parametrům dobrého embrya byla prokázána výrazně vyšší pravděpodobnost těhotenské ztráty (shodně 60 % při použití TL i u embryí hodnocených jen na základě morfologie).

Hodnocením poporodních komplikací v souvislosti s kontinuálním monitorováním embryí se zabýval Insua (Insua *et al.* 2017), který nezjistil žádné klinicky významné zvýšení

porodních nebo perinatálních rizik, což by potvrzovalo, že tato technologie nemá škodlivý vliv na vývoj embryí.

Rostoucí počet studií popisuje souvislost mezi nefyziologickým načasováním klíčových událostí ve vývoji časného embrya, implantačním potenciálem a výskytem aneuploidii v embryu (Swain 2013, Ottolini *et al.* 2013). Komplexnější informace o vývoji embryí získané pomocí kontinuálního monitorování mohou vést k objektivnějšímu výběru vhodných embryí pro přenos a / nebo kryokonzervaci nebo ke snížení počtu embryí, které mají být bioptovány v PGT programu (Swain 2013, Simon 2012), avšak v žádném případě metody PGT nenahrazuje (Zhang *et al.* 2017). Časový vývoj embrya pravděpodobně ovlivňují i kultivační podmínky a populační rozdíly, což komplikuje stanovení přesných fyziologických kritérií při vývoji embrya (Ciray *et al.* 2012, Cruz *et al.* 2013, Freour *et al.* 2013, Kirkegaard *et al.* 2013, Kirkegaard *et al.* 2013, Munoz *et al.* 2012).

Přínos kontinuálního monitoringu pro klinickou praxi se jeví významný jak pro jistější rozhodování při výběru embrya, tak při snaze o snížení procenta těhotenských ztrát. Rovněž může při pozorování nefyziologického vývoje embryí posloužit embryologovi jako indikace k PGT.

## 6 ZÁVĚRY

U žen léčených pro neplodnost jsem prokázala, že EG zvyšuje pravděpodobnost otěhotnění v průměru o 9 % (kultivace 48 h 5,4 %, 72 h 7,4 %, 96 h 9,2 %, 120 h 9,8 %). Pravděpodobnost otěhotnění klesala v závislosti na věku pacientek v době odběru. Délka kultivace naopak pravděpodobnost otěhotnění zvyšovala. Použití EG média nemá vliv na aborty po asistované reprodukci. Transfer embryí v EG médiu se jeví jako velmi pozitivní.

Dále jsem pozorovala pozitivní trend vlivu kontinuálního monitoringu na výběr nejlepšího embrya. Největší vliv na pravděpodobnost otěhotnění má z námi hodnocených parametrů dobrá kvalita embrya, hodnocení dynamiky ji však ještě zvyšuje (asi o 11%). Významný vliv byl prokázán na těhotenské ztráty, které byly při hodnocení dynamiky vývoje zásadně nižší, než při transferu zdánlivě stejně kvalitních embryí (6,6 %, vs. 22,5 %).

### **Hodnocení naplnění cílů:**

**1, Ověření přínosu transferového média EG na implantaci embryí v porovnání se standardními one-step médii G-TL (Vitrolife, Švédsko) a SAGE 1- step (Origio, Dánsko) a dále jeho možný vliv na těhotenské ztráty v programu asistované reprodukce.**

Dle dosažených výsledků potvrzují pozitivní ovlivnění pregnancy rate (PR) při použití transferového média EmbryoGlue.

Ovlivnění těhotenských ztrát použitím EG prokázáno nebylo.

**2, Ověření přínosu metody kontinuálního monitoringu použitím time-lapse systému Primo Vision. Posouzení vlivu správného výběru embryí při srovnání embryotransferu kvalitních embryí vybraných dle standardního hodnocení embryí a kvalitních embryí i s posouzením dynamiky vývoje. Dále pak posoudit vliv použité kultivační metody na těhotenské ztráty.**

Dle dosažených výsledků potvrzují pozitivní vliv správného výběru embrya na základě morfologie a zároveň i dynamiky vývoje na pregnancy rate (PR).

Těhotenské ztráty po transferu embryí z time-laps systému jsou významně nižší než po transferu embryí jevících se jako kvalitní jen na základě morfologie embrya.

## 7 Souhrn

Asistovaná reprodukce je rychle se rozvíjející obor, který stále přináší nové metody a postupy k zefektivnění léčby. První dítě počaté metodami *in vitro* se narodilo 25. července 1978 v Anglii díky embryologovi Robertu Edwards a lékaři Patriku Steptoem. Česká republika na svoje první dítě nečekala dlouho, to se narodilo v roce 1982 díky brněnskému týmu odborníků pod vedením Ladislava Pilky.

Cílem mé disertační práce bylo ověření přínosu média EG (Vitrolife, Švédsko) na implantaci embryí a prozkoumání možného vlivu na těhotenské ztráty v programu asistované reprodukce. Dále pak prozkoumání možného přínosu kontinuálního monitoringu vývoje embryí použitím metody time-lapse systému Primo Vision (Vitrolife, Švédsko) při posouzení vlivu správného výběru embryí při srovnání embryotransferu kvalitních embryí vybraných dle standardního hodnocení embryí a kvalitních embryí i s posouzením dynamiky vývoje. Rovněž zde jsem hodnotila vliv použité kultivační metody na těhotenské ztráty.

Zisk oocytů probíhal po řízené hyperstimulaci pod kontrolou ultrazvuku. Oplození očištěných zralých oocytů v metafázi II proběhlo metodou ICSI. Následovala klasická kultivace nebo time-lapse kultivace až do embryotransferu v komerčně dodávaných (certifikovaných pro použití ke kultivaci embryí) kultivačních médiích (SAGE 1-step, G-TL). Na základě výše popsaných hodnotících systémů bylo vybráno embryo (embrya) k přenosu do dělohy matky. Část z nich byla před ET kultivována v médiu EG. Za klinickou graviditu bylo označeno těhotenství, u kterých byl ultrazvukem prokázán gestační váček s přítomnou nebo nepřítomnou akcí srdeční. Biochemické gravidity nebyly do studie zahrnuty.

Na základě dosažených výsledků potvrzují pozitivní ovlivnění pregnancy rate (PR) při použití transferového média EmbryoGlue. Ovlivnění těhotenských ztrát použitím EG prokázáno nebylo. Pozitivní vliv time-lapse systému na pregnancy rate (PR) při výběru kvalitního a viabilního embrya na základě morfologie a zároveň i dynamiky vývoje byl rovněž prokázán. Zároveň bylo prokázáno, že těhotenské ztráty po transferu embryí z time-laps systému jsou významně nižší než po transferu embryí jevících se jako kvalitní jen na základě morfologie embrya.

Disertační práce potvrdila přínos používání EG i metody kontinuálního monitoringu vývoje embryí na PR, zároveň prokázala, že se nezvyšuje procento těhotenských ztrát. Oba postupy zlepšují výsledky a jsou ideální pro implementaci do klinické praxe. Přesto by mezi



nejzásadnější doporučení měla patřit snaha o otěhotnění včas, protože věk ženy má zásadní roli ve snaze o mateřství.

**Klíčová slova:** IVF, embryo monitoring, embryotranfer, EmbryoGlue, implantace

## 8 Summary

### **Monitoring of the early stage embryo and the implantation success rate**

Assisted reproduction is a fast-developing field constantly bringing new methods and procedures to make treatment more effective. The first child conceived by *in vitro* fertilisation was born on 25 July 1978 in England, thanks to the embryologist Robert Edwards and Dr Patrick Steptoe. The Czech Republic did not wait long for its first child, born in 1982 thanks to a team of experts from Brno led by Ladislav Pilka.

The aim of my dissertation was to verify the benefit of the EG medium (Vitrolife, Sweden) for embryo implantation and to examine the possible influence on pregnancy losses in the programme of assisted reproduction; then to examine the possible benefit of continuous monitoring of embryonic development using the method of Primo Vision time-lapse system (Vitrolife, Sweden) for the assessment of the influence of the correct selection of embryos, comparing the embryo transfer of good-quality embryos selected according to the standard embryo assessment and good-quality embryos also with the assessment of developmental dynamics. Here, I also evaluated the influence of the used cultivation method on pregnancy losses.

The oocytes were retrieved after controlled hyperstimulation monitored with ultrasound. The purified mature oocytes in metaphase II were fertilised by ICSI. Traditional cultivation or time-lapse cultivation followed until embryo transfer in commercially supplied (certified to be used for the cultivation of embryos) cultivation media (SAGE 1-step, G-TL). Based on the above-mentioned systems of assessment an embryo (embryos) was selected to be transferred into the mother's uterus. Prior to ET, some of them were cultivated in the EG medium. A pregnancy where ultrasound showed a gestational sac with or without heart action was described as clinical pregnancy. Biochemical pregnancies were not included in the study.

Based on the results achieved, I am able to confirm the positive influence of the EmbryoGlue transfer medium on the pregnancy rate (PR). The influence of EG on pregnancy losses was not proved. The positive influence of the time-lapse system on the pregnancy rate (PR) with the selection of a good-quality and viable embryo on the basis of morphology and also the developmental dynamics was also proved. At the same time, it was proved that pregnancy losses after embryo transfers from the time-laps system are significantly lower than after transfer of an embryo which seems to be good quality on the basis of the embryo morphology only.

The dissertation confirmed the benefit of EG use and the method of continuous monitoring of embryonic development on the PR and it also proved that the percentage of pregnancy losses does not increase simultaneously. Both procedures improve the outcomes and are ideal for implementation in clinical practice. Nevertheless, the most essential recommendation should be to try to become pregnant in time since a woman's age is fundamental in the effort to become a mother.

**Key words:** IVF, embryo monitoring, embryo transfer, EmbryoGlue, implantation

## 9 Literatura

1. Abusheikha, N., Salha, O., Sharma, V., Brinsden, P. Monozygotic twinning and IVF/ICSI treatment: a report of 11 cases and review of literature. *Hum. Reprod. Update.*, 2000, 6, p. 396–403.
2. Adamson, GD., Abusief, ME., Palao, L. et al. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril.*, 2016,105, p. 369-375.
3. Ahlstrom, A., Westin, C., Reismer, E., et al. T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod.* 2011, 26, p. 3289–3296.
4. ALPHA Scientists In Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online.*, 2011, 22, p. 632–646.
5. Alikani, M., Noyes, N., Cohen, J., Rosenwaks, Z. Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture. *Hum. Reprod.*, 1994, 9, p. 1318–1321.
6. Alikani, M., Cekleniak, NA., Walters, E., Cohen, J. Monozygotic twinning following assisted conception: an analysis of 81 consecutive cases. *Hum. Reprod.*, 2003, 18, p. 1937–1943.
7. Ambroggio, J., Gindoff, PR., Dayal, MB. et al. Multinucleation of a sibling blastomere on day 2 suggests unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertil Steril.* 2011, 96, p. 856–859.
8. Andonov, M., Kozoversusky, I., Markova, V., et al. How to improve embryo selection. Abstract of the 19 th Annual Meeting of the ESHRE, 2003, Madrid, Spain.

9. Ashary, N., Tiwari, A., Modi, D. Embryo Implantation: War in Times of Love. *Endocrinology*, 2018, 159, p. 1188-1198.
10. Aston, K.I., Peterson, C.M., Carrel, D.T. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction*, 2008, 136, p. 377–386.
11. Baccetti, B., Afzelius, B.A. Accessory structures of the sperm tail. In: *The Biology of the Sperm Cell*. Baccetti, B., Afzelius, B.A. (eds. ). Karger, S., Basel, Munchen, Paris, London, New York, Sydney, 1976, 109-135.
12. Baker, T.G., Eastwood, J. Origin and differentiation of germ cells in man. *Bibl. Anat.* 24, 1983, p. 67-76.
13. Balaban, B., Urman, B., Yakin, K., et al. High pregnancy and implantation rates can be achieved in blastocyst transfers using hyaluronan enriched culture and transfer medium. *Fertil. Steril.*, 2004, 82, p. 221-222.
14. Baltz, J.M. Media composition: salts and osmolality. *Methods Mol Biol.*, 2012, 912, p. 61–80.
15. Baltz, J.M. Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. *Curr Top Dev Biol.*, 2001, 52, p. 55–106.
16. Barlow, A.L., Hultén, M.A. Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet.*, 1998, 6, p. 350-358. 1998.
17. Bergh, T., Ericson, A., Hillensjö, T. et al. Deliveries and children born after in- vitro fertilization in Sweden 1982-95: A retrospective cohort study. *Lancet*, 1999, 354, s. 1579-1985.
18. Bontekoe, S., Johnson, N., Blake, D. Cochrane Database of Systematic Reviews. Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 2.

19. Boostanfar, R., Jain, JK., Slater, CC., et al. The prognostic significance of day 3 embryo cleavage stage on subsequent blastocyst development in a sequential culture system. *J Assist Reprod Genet.*, 2001, 18, p. 548-550.
20. Boone, WR., Johnson, J.E., Locke, A.J., Crane, M.M. 4th, and Price, T.M. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil. Steril.* 1999, 71, p. 150–154.
21. Bos-Mikich, A., Mattos, A. L. G., Ferrari, A. N. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 12, p. 2658- 2661.
22. Brady, P. C., Correia, K. F., Missmer, S. A., et al. Early  $\beta$ -human chorionic gonadotropin trends in vanishing twin pregnancies. *Fertil. Steril.*, 2013, 100, p. 116-121.
23. Braun, RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.*, 2001, 28, p. 10-12.
24. Brinster, RL., Cross, PC. Effect of copper on the preimplantation mouse embryo. *Nature.*, 1972, 238, p. 398-399.
25. Bulmer MG. The biology of twinning in man. Oxford, UK: Clarendon; 1970.
26. Burgoyne, PS. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals. *Hum Genet.*, 1982, 61, p. 85-90.
27. Burnham KP, Anderson DR. Model selection and Multimodel Inference. A Practical Information-theoretic Approach, 2nd edn. New York, USA, Springer, 2002.
28. Carson, DD., Dutt, A., Tang, JP. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev. Biol.*, 1987, 120, p. 228-235.

29. Cassuto, G., Chavrier, M., Menezo, Y. Culture conditions and not prolonged culture time are responsible for monozygotic twinning in human *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.*, 2003, 80, p. 462–463.
30. Ciray, H. N., Aksoy, T., Goktas, C., et al. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet.*, 2012, 29, p. 891–900.
31. Croxatto, HB., Ortiz, ME., Diaz, S., Hess, R. Attempts to modify ovum transport in women. *J Reprod Fertil.*, 1979, 55, p. 231-237.
32. Cruz, M., Garrido, N., Gadea, et al. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. *Reprod Biomed Online.*, 2013, 27, p.367–375.
33. Cohen, J., Alikani, M., Trowbridge, J., Rosenwaks, Z. Implantation enhancement by selective AH using zona drilling of embryos with poor prognosis. *Hum Reprod.* 1992, 7, p. 685–691.
34. Da Costa, ALE., Abdelmassih, S., de Oliveira, FG., et al. Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod.*, 2001, 2, p. 333–336.
35. Dale, B., Menezo, Y., Cohen, J. et al. Intracellular pH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod.*, 1998, 13, p. 964-970.
36. Demircan, A., Karacan, M., Sarac, G., et al. Early cleavage predicts success rate better than embryo morphology. Abstract of the 18 th Annual Meeting of the ESHRE,2002, Vienna, Austria.
37. Derom, C., Vlietinck, R., Derom, R., et al. Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *Lancet.*, 1987, 1, p. 1236–1238.

38. Dvořák, M., Trávník, P., Hanzelka, Z., et al. Ultrastructure and morphometric analysis of cytoplasmic structures in the human oocytes obtained from tertiary ovarian follicles. *Scripta Med.*, 1987, 60, p. 131-140.
39. Ebner, T., Tritscher, K., Mayer, RB., et al. Quantitative and qualitative trophectoderm grading allows for prediction of live birth and gender. *J Assist Reprod Genet.*, 2016, 33, p. 49-57.
40. Edwards, RG., Bavister, BD., Steptoe, PC. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vivo*. *Nature*, 1969, 221, p. 632-635.
41. Edwards, RG. Studies on human conception. *Am J Obstet Gynecol.* 1976, 117, p. 587-601.
42. Edwards, RG. Test tube babies. *Nature.*, 1981, 293, p. 253-256.
43. Escalier, D. The cytoplasmic matrix of the human spermatozoon: cross-filaments link the various cell components. *Biol Cell.*, 1984, 51, p. 347-364.
44. ESHRE/ALPHA. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.*, 2011, 26, p. 1270–1283.
45. Fancsovits, P., Murber, A., Tothne Gilan, Z., Rigo, J. Jr., Urbancsek, J. Effect of hyaluronan containing transfermedia on pregnancy and implantation rates in human IVF-ET cycles. A prospective randomized study. *Hum. Reprod.*, 2011, 26, p. 24.
46. Fancsovits, P., Lehner, A., Murber, et al. Effect of hyaluronan-enriched embryo transfer médium on IVF outcome: A prospective randomized clinical trial. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2015,291, p. 1173–1179.
47. Fauque, P., Audureau, E., Leandri, R. et al. Is the nuclear status of an embryo an independent factor to predict its ability to develop to term?. *Fertil Steril.* 2013, 99, p. 1299–1304.
48. Fawcett, DW. The mammalian spermatozoon. *Develop Biol.*, 1975, 44, p. 394-436.



49. Fawzy, M., Emad, M., Gad, MA., et al. Comparing 36.5°C with 37°C for human embryo culture: a prospective randomized controlled trial. *Reprod Biomed Online.*, 2018.
50. Fowler, MG., Kleinman, JC., Kiely, JL., Kessel, SS. Double jeopardy: twin infant mortality in the United States, 1983 and 1984. *Am J. Obstet. Gynecol.*, 1991, 165, p. 15–22.
51. Freour, T., Dessolle, L., Lammers, J., et al. Comparison of embryo morphokinetics after *in vitro* fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril.*, 2013, 99, p. 1944–1950.
52. Friedler, S., Schachter, M., Strassburger, D., et al. A randomized clinical trial comparing recombinant hyaluronan/recombinant albumin versus human tubal fluid for cleavage stage embryo transfer in patients with multiple IVF-embryo transfer failure. *Hum. Reprod.*, 2007, 22, p. 2444–2448.
53. Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., Rosado, A. Sperm chromatin. *Arch Androl.*, 2000, 45, p. 215-25, Review.
54. Gardner, DK., Rodriegez-Martinez, H., Lane, M. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglykan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, p. 2575-2580.
55. Gardner, DK., Stevens, J., Sheehan, CB., and Schoolcraft, W. Analysis of blastocyst morphology. in: K. Elder, J. Cohen (Eds.) *Human preimplantation embryo selection*. Informa Healthcare, London, 2007, p. 79–87.
56. Gardner, DK., Balaban, B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol. Hum Reprod.*, 2016, 22, p. 704–718.

57. Gardner, DK., Lane, M. Embryo culture systems. In: Gardner DK (ed). *In Vitro Fertilization a Practical Approach* . New York: Informa Healthcare, 2007, p. 221–282.
58. Gardner, DK., Lane, M., Schoolcraft, WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod.* 2000, 6, p. 9-23.
59. Gardner, DK., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., and Schoolcraft, WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome. *Fertil Steril.* 2000, 73, p. 1155–1158.
60. Gardner, DK. and Schoolcraft, WB. *In vitro* culture of human blastocyst. in: R. Jansen, D. Mortimer (Eds.) *Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond*. Parthenon Press, Carnforth, 1999, p. 378–388.
61. Gardner, DK., Surrey, E., Minjarez, D., et al. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2004, 81, p. 551–555.
62. Glujovsky, D., Farquhar, C., Quinteiro Retamar, AM., et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2016, 30.
63. Hall, JG. Twinning. *Lancet*, 2003, 362, p. 735–43.
64. Hall, J., Gilligan, A., Schimmel, T., Cecchi, M., and Cohen, J. The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. *Hum. Reprod.*, 1998, 13, p. 146–155.
65. Halvaei, I., Khalili, MA., Esfandiari, N., et al. Ultrastructure of cytoplasmic fragments in human cleavage stage embryos. *J Assist Reprod Genet.*, 2016, 33, p. 1677-1684.
66. Hamamy, HA., Ajlouni, HK., Ajlouni, KM. Familial monozygotic twinning: report of an extended multi-generation family. *Twin Res* 2004, 7, p. 219–22.
67. Hambiliki, F., Ljunger, E., Karlström, PO., Stavreus-Evers, A. Hyaluronan-enriched transfer médium in cleavage-stage frozen-thawed embryo transfers increases

- implantation rate without improvement of delivery rate. *Fertil. Steril.*, 2010,94, p. 1669–1673.
68. Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., and Lundin, K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001, 16, p. 313–318.
69. Harvey, MAS., Huntley, RMC., Smith, DW. Familial monozygotic twinning. *J Pediatr.*, 1977, 90, p. 246–249.
70. Hauzman, E., Murber, A., Fancsovits, P., et al. Use of biochemical markers to predict the outcome of pregnancies conceived by *in vitro* fertilization. *Orv. Hetil.*, 2006, 30, 147, p. 1409-1440.
71. Hazlett, WD., Meyer, LR., Nasta, TE., et al. Impact of EmbryoGlue as the embryo transfer médium. *Fertil. Steril.*, 2008, 90, p. 214–216.
72. Hentemann, M., Mousavi, K., Bertheussen, K. Differential pH in embryo culture. *Fertil Steril.*, 2011, 15, 95, p. 1291-1294.
73. Hill, MJ., Richter, K.S., Heitmann, R.J., et al. Trophoctoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertility and Sterility.*, 2013, 99, p. 1283-1289.
74. Hlinka, D., Lazarovská, S., Rutarová, J., et al. Neinvazívne meranie dĺžky bunkového cyklu v prvých dňoch embryonálneho vývoja – objektívne merateľný ukazovateľ životaschopnosti ľudských embryí. *Čes. Gynek.*, 2012, 77, 1, s. 52–57.
75. Hlinka D. Přednáška. 14. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 25. symposium asistované reprodukce. 2015. Brno.
76. Hlinka D. Přednáška. 16. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 27. symposium asistované reprodukce. 2017. Brno.

77. Ho, HC. And Wey, S. Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microscopic Research and Technique.*, 1970, p. 719–723.
78. Hogarth, C., Itman, C., Jans, DA., Loveland, KL. Regulated nucleocytoplasmic transport in spermatogenesis: a driver of cellular differentiation? *Bioessays.* 2005, 27, p. 1011-25. Review.
79. Holland, MK., White, IG. Heavy metals and spermatozoa. 1. Inhibition of the motility and metabolism of spermatozoa by metals related to copper. *Fert Steril.*, 1980, p. 483-489.
80. Holyoak, GR., Wang, S., Liu, Y., Bunch, TD. Toxic effects of ethylene oxide residues on bovine embryos *in vitro*. *Toxicology.* 1996, 108, p. 33-38.
81. Honnma, H., Baba, T., Sasaki, M., et al. Trophectoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.*, 2012, 98, p. 361–367.
82. Hviid, KVR., Malchau, SS., Pinborg, A., Nielsen, HS. Determinants of monozygotic twinning in ART: a systematic review and a meta-analysis. *Hum Reprod Update.*, 2018.
83. Check, ML., Check, JH., Summers-Chase, D., et al. Pregnancy/implantation rates as related to age following transfer of frozen embryos produced by ICSI. *Arch Androl.*, 2001, 47, p. 161-165.
84. Chen, C. and Kattera, S. Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage stage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertil Steril.*, 2006, 85, p. 347–352.
85. Christopher, J., De Jonge and Christopher, LR. Barratt. *The sperm cell.* Cambridge University Press., 2002, Second edition.

86. Ioannidis, G., Sacks, G., Reddy, N. et al. Day 14 maternal serum progesterone levels predict pregnancy outcome in IVF/ICSI treatment cycles: a prospective study. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 3, p. 741 -746.
87. Insua, MF., Cobo, A., Larreategui, Z., et al. Obstetric and perinatal outcomes of singleton newborns using time lapse monitoring. *Fertil Steril.*, 2017,108, p. 498-504.
88. Jones, RE., Lopez, K. H. Sperm Guidance. In *Human Reproductive Biology (Fourth Edition)*, 2014.
89. Joris, H., Nagy, Z., Van de Velde, H. et al. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. Review. *Hum. Reprod.*, 1998, 13, p. 76-86.
90. Kiessling, A. Timing is everything in the human embryo. *Nature Biotechnol*, 2010, 28, p. 1025–1026.
91. Kieslinger, DC., De Gheselle, S., Lambalk, CB., et al. Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. *Hum Reprod.*, 2016, 31, p. 2450-2457.
92. Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., et al. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol.*, 2008, 52, p. 677-82.
93. Kim, J. H., Shin, M. S., Yi, G., et al. Serum biomarkers for predicting pregnancy outcome in women undergoing IVF: human chorionic gonadotropin, progesterone, and inhibin A level at 11 days post- ET. *Clin. Exp. Reprod. Med.*, 2012, 39, p. 28-32.
94. Kirkegaard, K., Hindkjaer, J. J., and Ingerslev, H. J. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril.*, 2013, 99, p. 738–744.

95. Kirkegaard, K., Hindkjaer, J. J., and Ingerslev, H. J. Hatching of *in vitro* fertilized human embryos is influenced by fertilization method. *Fertil Steril.*, 2013, 100, p.1277–1282.
96. Kirkegaard, K., Ahlström, A., Ingerslev, HJ., et al. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil. Steril.*, 2015, 2, p. 323-332.
97. Khoudja, R. Y., Xu, Y., Li, T., and Zhou, C. Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013, 30, p. 69–76.
98. Králíková M. et al. Výužití biomarkerů v gynekologii a reprodukční endokrinologii, 2012, Tribun EU.
99. Knopman, J., Krey, LC., Lee, J., et al. Monozygotic twinning: an eight-year experience at a large IVF center. *Fertil Steril.*, 2010, 94, p. 502–10.
100. Korosec, S., Virant-Klun, I., Tomazevic, T., et al. Single fresh and frozen-thawed blastocyst transfer using hyaluronan-rich transfer médium. *Reprod. Biomed. Online*, 2007,15, p. 701–707.
101. Kozlovsky, P.,Gefen, A.Sperm penetration to the zona pellucida of an oocyte: a computational model incorporating acrosome reaction. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.*, 2013,16, p. 1106-11.
102. Kučera, E., Křepelka, P., Krofta, L., et al. Těhotenské komplikace po intrauterinní hysteroskopické chirurgii. *Čes.Gynek.*, 2005, 70, s. 312-316.
103. Langley, M., Marek, D., Cieslak, J., et al. Successful Day 5 embryo transfer and pregnancies resulting after transport of embryos by air for biopsy and genetic analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2001, 18, p. 330-335.
104. Lemmen, JG., Agerholm, I., Ziebe, S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*, 2008, 17, p. 385–391.

105. Lichtenstein, P., Otterblad-Olausson, P., BengtKallen, AJ. Twin births to mothers who are twins: a registry based study. *Br Med. J.*, 1996, 312, p. 879–881.
106. Lundin, K., Bergh, C., Hardarson, T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 12, p. 2652-2657.
107. Lorange, J., Guerin, JF., Czyba, JC. Glycolytic activity of human spermatozoa in normospermic men and in men with abnormal spermograms. *Arch Androl.*, 1986, 16, p.81-88.
108. Loutradi, KE., Prassas, I., Bili, E., et al. Evaluation of a transfer médium containing high concentration of hyaluronan in human *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 2007, 87, p. 48-52.
109. Lundin, K., Ahlstrom, A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod Biomed Online.*, 2015, 31, p. 459–471.
110. Lynn, A., Koehler, KE., Judis, L., et al. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science.* 2002, 296, p. 2222-2225.
111. Madar, J., Pěkníková, J., Šůla, K., et al. Anti-trophoblast and anti-cardiolipin immunity in repeated miscarriages – diagnosis and treatment. *J. Reprod. Immunol.*, 2003, 58, p. 179-180.
112. Mahadevan, MM., Fleetham, J., Church, RB., Taylor, PJ. Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, HEPES or phosphate. *J Vitro Fertil Embryo Transfer.*, 1986, 3, p. 304-308.
113. Mahani, IM., Davar, R. Hyaluronic acid versus albumin inhuman embryo transfer médium. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 2007, 13, p. 876–880.
114. Mateizel, I, Santos-Ribeiro, S., Done, E., et al. Do ARTs affect the incidence of monozygotic twinning? *Hum Reprod.*, 2016, 31, p. 2435-2441.

115. Matyas, SZ., Kovacs, P., Forgacs, V., et al. Selection of single blastocyst for transfer using time-lapse monitoring during *in vitro* fertilization in good prognosis patients: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.*, 2015, 30, p. 119.
116. Martínez-Granados. L., Serrano. M., Gonzalez-Utor. A. et al. Inter-laboratory agreement on embryo classification and clinical decision: Conventional morphological assessment vs. time lapse. 2017.
117. McLaren, A. Sex determination in mammals. *Trends Genet.*, 1988, 4, p. 153-157. Review.
118. Medawar, P. B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1953, 7, p. 320-328.
119. Meistrich, ML., Mohapatra, B., Shirley, CR., Zhao, M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*. 2003, 111, p. 483-488. Review.
120. Merton, J. S., Vermeulen, Z. L., Otter, T., et al. Carbon-activated gas filtration during *in vitro* culture increased pregnancy rate following transfer of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2007, 67, p. 1233–1238.
121. Ménézo, YJ., Sakkas, D. Monozygotic twinning: is it related to apoptosis in the embryo? *Hum Reprod.*, 2002, 17, p. 247-248.
122. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*, 2011, 26, p. 2658–2671.
123. Midgley, AR., Sadler, WA. Ovarian follicular development and function. Raven Press, 1979, New York.
124. Miki, K. Energy metabolism and sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl.*, 2007, 65, p. 309-325.



125. Milki, AA., Juan, SH., Hickley, MD., et al. Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavagelstage transfer. *Fertil. Steril.*, 2003, 79, p. 503–506.
126. Mehlmann, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 2005, 130, p. 791–799.
127. Meintjes, M. CO<sub>2</sub> and low-O<sub>2</sub> incubators. in: Z. Nagy, A. Varghese, A. Agarwal (Eds.) *Practical Manual of In Vitro Fertilization*. Springer, New York, 2012, p. 61–70.
128. Moley, KH., Chi, MM., Knudson, CM., et al. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med.*, 1998, 4, p. 421–424. Menezo, YJR., Sakkas, D. Monozygotic twins: Is it related to apoptosis in the embryo? *Hum Reprod.*, 2002, 17, p. 247–251.
129. Mooney, C. E., Winston, R. M. L., Dawson, K. J. The early cleavage of embryos to the two – cell stage after ICSI is a good predictor of pregnancy outcome. Abstract of the 17 th Annual Meeting of the ESHRE, 2001, Lausanne, Switzerland.
130. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., Guller, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Acad Sci.*, 2011, 1221, p. 80-87.
131. Munoz, M., Cruz, M., Humaidan, P., et al. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online.*, 2012, 25, p. 382–389.
132. Munoz, M., Cruz, M., Humaidan, P., et al. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2013, 168, p. 167–172.

133. Nakagawa, K., Takahashi, C., Nishi, Y., et al. Hyaluronan-enriched transfer médium improves outcome in patients with multiple embryo transfer failures. *J Assist. Reprod. Genet.* 2012, 29, p. 679–685.
134. Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet.*, 2010, 27, p. 93–96.
135. Nouza, K., Madar, J., Kučera, E., Nouza, M., Tolarová, M., Nováková, D. Mechanismy ovlivňující implantaci embrya – co je nového v posledních letech. *Čes. Gynek.* 2006, 71, s. 489-494.
136. Nussbaum, R.I., McIlnes, R.R., Willard, H.F. In: Thompson and Thompson, *Klinická genetika.* 2004. 6. vydání, Triton.
137. Nyberg, D.A., Filly, R.A., Goibus, M.S., Stephens, J.D. Entangled umbilical cords: a sign of monoamniotic twins. *J Ultrasound Med.*, 1984, 3, p. 29–32.
138. Okamura, N., Tajima, Y., Ishikawa, H., et al. Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. *Fert Steril.*, 1986, 45, p. 265-272.
139. Oliva, R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.*, 2006, 12, p. 417-35. Review.
140. Otani, H., Tanaka, O., Kasai, K., Yoshioka, T. Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized ganges. *Anatomical Record.*, 1988, 222, p. 26–33.
141. Ottolini, C., Rienzi, L., Capalbo, A. A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging. *Reprod Biomed Online.*, 2013, 28, p. 273–275.

142. Ottosen, LM., Hindkjær, J., Ingerslev, J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet.*, 2007, 24, p. 99–103.
143. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.*, 1992, 4, p. 17-18.
144. Park, H., Bergh, C., Selleskog, U., et al. No benefit of culturing embryos in a closed system compared with a conventional incubator in terms of number of good quality embryos: results from an RCT. *Hum Reprod.*, 2015, 30, p. 268–275.
145. Pickering, SJ., Taylor, A., Johnson, MH., and Braude, P.R. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Hum Reprod.*, 1995, 10, p.1912–1922.
146. Poikkeus, P., Hiilesmaa, V., Tiitinen, A. et al. Serum hCG 12 days after embryo transfer is predicting pregnancy outcome. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, p. 1901-1905
147. Popescu, F., Jaslow, CR., Kutteh, WH. Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. *Hum Reprod.*, 2018, 1, 33, p. 579-587.
148. Quinn, P., Kerin, JF., Warnes, GM. Improved pregnancy un human un vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fert Steril.*, 1985, 44, p. 493-498.
149. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.

150. Racowsky, C., Ohno-Machado, L., Kim, J., and Biggers, J. D. Is there an advantage to scoring embryos on more than one day? *Hum Reprod.*, 2009, 24, p. 2104–2113.
151. Racowsky, C., Vernon, M., Mayer, J., et al. Standardization of grading embryo morphology. *J Assist Reprod Genet.*, 2010, 27, p. 437–439.
152. Ravhon, A., Nahum, H., Weissman, A., et al. Embryo transfer in hyaluronan enriched transfer medium does not improve pregnancy rate in IVF treatment. *Fertil. Steril.*, 2005, 84, p. 376–377.
153. Schachter, M., Raziel, A., Friedler, S., et al. Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, p. 1264–1269.
154. Salustri, A., Camaioni, A., Di Giacomo, M., et al. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum. Reprod. Update*, 1999, 5, p. 293-301.
155. Sakkas, D., Percival, G., D’Arci, Y., et al. Assessment of early cleaving *in vitro* fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil. Steril.*, 2001, 76, 6, p. 1150-1156.
156. Sathananthan, AH., Selvaraj, K., Girijashankar, ML. et al. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech.*, 2006, 69, p. 396-407.
157. Scott, L., Finn, A., O’Leary, et al. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod.*, 2007, 22, p. 230–240.
158. Shahine, LK., Caughey, AB. Preimplantation genetic diagnosis: the earliest form of prenatal diagnosis. *Gynecol Obstet Invest.*, 2005, 60, p. 39-46. 16.

159. Shoukir, Y., Campana, A., Farley, T., et al. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod.*, 1997, 12, 7, p. 1531-1536.
160. Schinzel, A., Smith, DW., Miller, JR. Monozygotic twinning and structural defects. *J. Pediatr.*, 1979, 95, p. 921-924.
161. Schoolcraft, W. Increased hyaluronan concentration in the embryo transfer médium results in a significant increase in human embryo implantation rate. *Fertil. Steril.*, 2002, 76, Suppl., p. 1-11.
162. Sills, ES., Moomjy, M., Zaninovic, N., et al. Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF. *Hum. Reprod.*, 2000, 15, p. 890-895.
163. Simon, A., Safran, A., Revel, A., et al. Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer médium. *Fertil. Steril.*, 2003, 79, p. 1434-1438.
164. Singh, N., Goyal, M., Malhotra, N. et al. Predictive value of early serum beta-human gonadotropin for the successful outcome in women undergoing *in vitro* fertilization. *J Hum. Reprod. Sci.*, 2013, 6, s. 245-247.
165. Singh, N., Gupta, M., Kriplani, A., Vanamail, P. Role of Embryo Glue as a transfer médium in the outcome of fresh non-donor in-vitro fertilization cycles. *J. Hum. Reprod. Sci.*, 2015, 8, p. 214-217.
166. Siristatidis, C., Komitopoulou, MA., Makris, A., et al. Morphokinetic parameters of early embryo development via time lapse monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet.*, 2015, 32, p.563-570.

167. Swain, J. E. Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS? *J Assist Reprod Genet.*, 2013, 30, p. 1081–1090.
168. Simon, A., Laufer, N. Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF) *J Assist Reprod Genet.*, 2012, 29, p. 1227–1239.
169. Skiadas, CC., Missmer, SA., Benson, CB., et al. Risk factors associated with pregnancies containing a monochorionic pair following assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.*, 2008, 23, p. 1366–1371.
170. Snustad, P. D., Simmons, M. J. 2008. *Principles of Genetics*, 5 edition. ed. Wiley, Hoboken, NJ.
171. Snyman, E., Van der Merwe, JV. Endotoxin-polluted medium in a human *in vitro* fertilization program. *Fert Steril.*, 1986, 46, p. 273-276.
172. Sobek, A. Jr., Zbořilová, B., Procházka, M., et al. High incidence of monozygotic twinning after assisted reproduction is related to genetic information, but not to assisted reproduction technology itself. *Fertil Steril.* 2015, 103, p. 756-60.
173. Solari, AJ. The behavior of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol.*, 1974, 38, p. 273-317.
174. Steer, C. V., Mills, C. L., Tan, SL., et al. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod.*, 1992, 7, p.117–119.
175. Sun XF, Zhang WH, Chen XJ, Xiao GH, Mai WY, Wang WH. Spindle dynamics in living mouse oocytes during meiotic maturation, ageing, cooling and overheating: a study by polarized light microscopy. *Zygote* 2004;12:241–249.

176. Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A., Oko, R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech.*, 2003, 61, p. 362-78. Review.
177. Sutovsky, P., Moreno, RD., Ramalho-Santos, J., et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature.*, 1999, 402, p. 371-2.
178. Sutovsky, P., Ricardo, D., Moreno, J., et al. Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos. *Biology of Reproduction.*, 2000, 63, p.582–590
179. Svobodova, M., Březinova, J., Oborna, I., et al. Transferové médium s hyaluronanem EmbryoGlue v programu IVF+ET. *Čes.Gynek.*, 2007, 72 s. 15-19.
180. Swain, JE., Pool, TB. New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.*, 2009, 18, p. 799–810.
181. Talbert, DG., Bajoria, R., Sepulveda, W. Hydrostatic and osmotic pressure gradients produce manifestation of fetofetal transfusion syndrome in a computerized model of monochorial twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, 1996, 174, p. 598–608.
182. Tanaka, H., Matsuoka, Y., Onishi M., et al. Expression profiles and single-nucleotide polymorphism analysis of human HANP1/H1T2 encoding a histone H1-like protein. *Int J Androl.*, 2006, 29, p. 353-9.
183. Tesarik, J., Greco, E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, p. 1318–1323.
184. Thum, M. Y., Wells, V., and Abdalla, H. Patient selection criteria for blastocyst culture in IVF/ICSI treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2010, 27, p. 555–560.

185. Trávník, P., Tesařík, J., Šťastná, J. Medium pro oplození lidských vajíček a jejich kultivaci. Autorské osvědčení ČSSR č. 257. 097,1987, Praha.
186. Trávník, P., 2017, Přednáška IPVZ, Klinická embryologie, Praha.
187. Trávník, P., Reprodukční medicína. Současné možnosti v asistované reprodukci. In Jitka Řezáčová et.al. 2018, Mladá fronta, s. 710.
188. Turley, E., Moore, D. Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 121, p. 808-814.
189. Urman, B., Yakin, K., Ata, B., et al. Effect of hyaluronan-enriched transfer médium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 embryo transfers: A prospective randomized study. *Fertil. Steril.*, 2008,90, p. 604–612.
190. Vacek, Z. Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Grada, Praha, 2006. 1 vyd. 255 s.
191. Van Royen, E., Mangelschots, K., Vercruyssen, M. et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2003, 18, p.1062–1069.
192. Vitthala, S., Gelbaya, TA., Brison, DR., et al. The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.*, 2009, 1, p. 45–55.
193. Wale, PL., Gardner, DK. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biol Reprod*, 2012,87, 24, p. 1–8.
194. Wartenberg, H. Entwicklung der Genitalorgane und Bildung der Gameten. In: Hinrichsen KV (ed.), *Humanembryologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1990.



195. Wang, H., Matsumoto, H., Guo, Y. et al. Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, p. 14914–14919.
196. Wang, Y. A., Chapman, M., Costello, M., and Sullivan, EA. Better perinatal outcomes following transfer of fresh blastocysts and blastocysts cultured from thawed cleavage embryos: a population-based study. *Hum. Reprod.*, 2010, 25, p. 1536–1542.
197. Will, MA., Clark, NA., Swain, JE. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *J Assist Reprod Genet.*, 2011, 28, p. 711-24.
198. Wong, CC., Loewke, KE., Bossert, NL., et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*, 2010, 28, p. 1115–1121.
199. Wong, C., Loewke, K., Bossert, N. et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*. 2010, 28, p. 1115–21.
200. Wright, V., Schieve, LA., Vahratian, A., Reynolds, MA. Monozygotic twinning associated with day 5 embryo transfer in pregnancies conceived after IVF. *Hum Reprod.*, 2004, 19, p. 1831–1836.
201. Yanagimachi, R. Sperm capacitation and gamete interaction. *J Reprod Fertil Suppl.*, 1989, 38, p. 27-33. Review.
202. Yanagishita, M. Proteoglycans and hyaluronan in female reproductive organs. *Proteoglycans*, 1994, 70, p. 179-190.
203. Yong, HY., Pyo, BS., Hong, JY., et al. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3-4 micro m diameter injection pipette. *Hum. Reprod.*, 2003, 18, p. 2390-2396.

204. Yu, CH., Zhang, RP., Li, J., A, ZC. A predictive model for high-quality blastocyst based on blastomere number, fragmentation, and symmetry. *J Assist Reprod Genet.*, 2018.
205. Zhang, J., Tao, W., Liu, H., et al. Morphokinetic parameters from a time-lapse monitoring system cannot accurately predict the ploidy of embryos. *J Assist Reprod Genet.*, 2017,34, p. 1173-1178.
206. Ziebe, S., Petersen, K., Lindenberg, S., et al. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.*, 1997, 12, p. 1545–1549.

## 10 Seznam použitých zkratk

**AEA** N-arachidonoylethanolamid

**AIC** Akaikeho informační kritérium

**AH** asistovaný hatching

**AMH** Anti-Müllerian hormon

**AR** asistovaná reprodukce

**BMP-15** autokrinní faktor

**CB1** cannabinoid receptor type 1

**CE IVF** nezávislé ověření posouzení shody výrobku s požadavky příslušných nařízení vlády, které provádí výrobce pro přístroje a materiál používaný v IVF

**CMV** cytomegalovirus

**CO<sub>2</sub>** oxid uhličitý

**D2** druhý den kultivace

**D3** třetí den kultivace

**D4** čtvrtý den kultivace

**D5** pátý den kultivace

**DNA** deoxyribonukleová kyselina

**DZT** dizygotní dvojčata

**EBV** virus Epstein-Barrové

**EDTA** kyselina ethylendiamintetraoctová

**EG** EmbryoGlue, transferové médium, výrobce Vitrolife

**ERK** extracellular regulated-signal kinase, extracelulárně regulovaná kináza

**ESHRE** European Society for Human Reproduction and Embryology

**ET** embryotransfer

**GDF-9** autokrinní faktor

**GLM** generalizovaný lineární model

**G-TL** jednokrokové kultivační médium, výrobce Vitrolife

**HA** hyaluronan

**hCG** lidský choriový gonadotropin

**HEPES** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina - součást pufrů

**ICM** Inner Cell Mass - jiný název pro embryoblast

**ICSI** Intracytoplasmic Sperm Injection - injekce spermie do cytoplazmy oocyty

**IMSI** Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection

**IR** implantacion rate  
**IVF** *In Vitro* Fertilization - mimotělní oplození  
**lagon** dlouhý agonistický stimulační protokol  
**LH** Luteinizing Hormone, luteotropin  
**MZT** monozygotní dvojčata  
**NPB** nuclear polar bodies  
**PAR1 a PAR2** pseudoautozomální úseky na chromozomech X a Y  
**PB** Polar Body - pólocyt  
**PESA** Percutaneous Epidydimal Sperm Aspiration  
**PICSI** Physiological ICSI nebo Preselected ICSI  
**PGT** preimplantační genetické techniky (PGS preimplantační genetický screening a PGD preimplantační genetická diagnostika)  
**PN** pronukleární stádium  
**PR** pregnancy rate  
**R** statistický program (R Core Team, 2017)  
**MESA/ MESE** Microsurgical Epidydimal Sperm Aspiration/ Extraction  
**MII** metafáze II  
**RNA** kyselina ribonukleová  
**SAGE 1- step** jednokrokové kultivační médium, výrobce Sage  
**sagon** krátký agonistický stimulační protokol  
**santa** antagonistický stimulační protokol  
**SGF** Seminal Growth Factor - seminální růstový faktor  
**SGP-2** sulfátovaný glykoprotein Sertoliho buněk  
**SOAF** Sperm Oocyte Activating Factor - faktor ze spermií, který aktivuje oocyt při oplození  
**SRY** sex-determinující faktor Y, gen na chromozomu Y  
**TE** trofoektoderm  
**TESA/TESE** Testicular Sperm Aspiration /Extraction  
**TL** time-lapse, kontinuální monitoring vývoje na časové ose  
**UZ** ultrazvukové vyšetření  
**ZP** zona pellucida

## 11 Seznam tabulek

Tabulka 1 Morfologické rozměry lidských spermií (podle Schirren 1982).....	10
Tabulka 2 Hodnocení embryí dle Gardnera .....	34
Tabulka 3 Hodnocení fragmentace embryí .....	34
Tabulka 4 Srovnání pacientek – vstupní parametry skupiny EmbryoGlue.....	46
Tabulka 5 Závislost PR na době kultivace a použití EG.....	47
Tabulka 6 Podpora modelů s jedním prediktorem ve srovnání s modelem jen s interceptem, který neobsahoval prediktor .....	47
Tabulka 7 Struktura kombinovaných modelů, jejichž AIC se od nejlepšího modelu lišilo o méně než 2.....	47
Tabulka 8 Porovnání pacientek – vstupní parametry soubor kontinuální monitoring .....	49
Tabulka 9 Podpora jednotlivých modelů vysvětlujících vliv kontroly kvality vývoje a monitoringu na pravděpodobnost otěhotnění podle AIC. ....	49
Tabulka 10 Pravděpodobnost otěhotnění (pregnancy rate) jednotlivých skupin pacientek (95% meze spolehlivosti), rozdělených na základě kultivace a kvality transferovaného embrya předpovězené modelem, který obsahoval kvalitu vývoje, monitoring a interakci monitoring*kvalita vývoje .....	50
Tabulka 11 Pravděpodobnost abortů jednotlivých skupin pacientek, rozdělených na základě kultivace a kvality transferovaného embrya předpovězené modelem, který obsahoval kvalitu vývoje, monitoring a interakci monitoring*kvalita vývoje .....	50

## 12 Seznam obrázků

Obrázek 1 Zralý oocyt v metafázi II zracího dělení (foto Zbořilová).....	9
Obrázek 2 Stavba spermie: A - průřez hlavičkou, B - průřez krčkem, C - průřez hlavním oddílem bičíku, D - průřez terminální částí: a - vnější akrozomální m., b - vnitřní akrozomální m., c - cytoplazmatická m., d - perinukleární matrix, e - jaderný obal, pc - proximální centriol, mp - mitochondriální pochva, zdv - zevní denzní vlákna, pdm - periferní dvojice mt., cdm - centrální dvojice, mt. fp - fibrózní pochva. (podle Trávník, 2017).....	11
Obrázek 3 Migrace primordiálních pohlavních buněk do genitální lišty v 3. až 6. týdnu vývoje embrya. (Trávník 2017).....	13
Obrázek 4 Meióza I - Leptotenní stadium: A – dvě chromatidy otcovského a dvě mateřského původu, B – sesterské chromatidy jsou spojeny synaptonemálními komplexy, C – nesesterské chromatidy se překřížily, překřížení chromatid s rekombinačním uzlíkem, co1 – překřížení chromatid s rekombinačním uzlíkem, co2 – překřížení chromatid s rekombinačním uzlíkem. D – stav ke konci diplotenního stadia s vyměněnými úseky chromatid. (Trávník 2017). .....	15
Obrázek 5 Schéma spermatogeneze a spermiogeneze (zdroj. <a href="http://slideplayer.cz/slide/3340846/">http://slideplayer.cz/slide/3340846/</a> ) .....	20
Obrázek 6 Uložení jednotlivých stádií vývoje spermií ve varleti. <a href="http://medcell.med.yale.edu/histology/testis_sperm_development.php">http://medcell.med.yale.edu/histology/testis_sperm_development.php</a> .....	21
Obrázek 7 Oplození lidského oocytu .....	23
Obrázek 8 Oplozená zygota (prvojádro) s prvojádry a prvním a druhým pólovým tělískem (foto Zbořilová). .....	24
Obrázek 9 Normální dělení embrya od oplození do 96 hodin vývoje (podle Hlinky 2017). ...	25
Obrázek 10 Kamera ke kontinuálnímu monitoringu Primo Vision, umístění kamer v inkubátoru.....	28
Obrázek 11 Kultivační systém EmbryoScope.....	29
Obrázek 12 Speciální kultivační miska pro time-lapse systém Primo Vision .....	29
Obrázek 13 Schéma mitotické poruchy zaznamenané při kontinuálním monitoringu - embryonální mozaicismus. Poměr euploidních (zeleně) a aneuploidních (modře - abnormální dělení a následná fúze blastomer) buněk můžeme stanovit metodami preimplantačních genetických technik. Chromozomální aneuploidie vynikají jako následek poruchy dělení časného embrya. Ztráta nebo získání chromozomů během mitotického dělení neovlivňuje ploidii všech buněk embrya (dle Hlinky 2015) .....	30

Obrázek 14 Schematické znázornění časového průběhu a definování prvních 4 buněčných cyklů u lidských embryí, jejichž vývoj vedl ke vzniku klinického těhotenství. (Hlinka et al. 2012).....	30
Obrázek 15 Schéma mitotické poruchy zaznamenané při kontinuálním monitoringu - plně aneuploidní embryo po abnormálním prvním dělení. Můžeme potvrdit metodami preimplantačních genetických technik (Hlinka 2015).....	31
Obrázek 16 Klasifikace PN (podle Tesaříka <i>et al.</i> 1999).....	33
Obrázek 17 Hodnocení jader v blastomerech: A, monojaderné blastomery, B, monojaderné i multijaderné blastomery, C, multijaderné blastomery .....	35
Obrázek 18 Závislost pravděpodobnosti otěhotnění na věku, době kultivace a aplikaci EG u pacientek bez EG (a) a s EG (b), jak ji předpovídá nejlepší model pro pacientky stimulované lagon a s průměrným počtem oocytů. ....	48

## 13 Vlastní publikace, postery, přednášky

Publikace:

1. Capkova, P., Sobek, A. Jr., Sobek, A., Adamova, K., Santava, A., **Hladikova, B.**, Krskova, A., Santavy, J. Low-Level Gonosomal Mosaic (LLGM) In Female Reproduction. Significance of gonosomal mosaicism (GM) in etiology of female reproduction impairment. Pilot study. Chromosome research., 2007, 15, p. 27.
2. Capkova, P., Sobek, A. Jr., Sobek, A., Adamova, K., **Hladikova, B.**, Krskova, M., Chytilikova, R., Santavy, J. Low level OF chromosome mosaicism X aneuploidy (low level gonosomal mosaicism=LLGM) in human reproduction assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). Chromosome Research. 2009, p.178-179.
3. Capkova, P., Santava, A., Krskova, M., Adamova, K., **Hladikova-Zborilova, B.**, Nedomova, R., Sobek, A., Curtisova, V., Dhaifalah, I. Low-Level Gonosomal Mosaic (LLGM) In Female Reproduction. Obstetrics & Gynecolo., 2014, Article ID 884168, p- 1-10.
4. Filipcikova, R., Oborna, I., Brezinova, J., Bezdicikova, M., Laichman, S., Dobias, M., Blazkova, Z., **Hladikova, B.**, Pastucha, D. Dehiscent scar in the lower uterine segment after Caesarean section and IVF infertility treatment: a case report. Biomed Pap Med., 2014, 158(4), p. 654-658.
5. **Hladíková, B.**, Zbořil, J., Tkadlec, E. 2008. Populační dynamika prasete divokého (*Sus scrofa*) na střední Moravě (*Artiodactyla: Suidae*). Lynx (Praha), n. s., 39,p. 55–62.
6. Klásková, E., Tüdös, Z., Sobek, A., Zapletalová, J., Dostál, J., **Zbořilová, B.**, Sobek, A. Jr., Adamová, K., Lattová, V., Dostálová, Z., Procházka, M. Low-level 45,X/46,XX mosaicism is not associated with congenital heart disease and thoracic



aorta dilatation:prospective magnetic resonance imaging and ultrasound study.Ultrasound Obstet Gynecol., 2015, 45, p. 722-727.

7. Oborna, I. a **Zborilova, B.** Asistovaná reprodukce. Časopis Practicus., 2015, 4, p. 16-18.
8. Sobek, A., Koutná, O., Sobek, A. Jr., Holub, P., **Zbořilová, B.**, Klásková, E., Procházka, M. Aspiration of functional ovarian cyst. Ceska Gynekol., 2017, 82, s. 450-454.
9. Sobek, A. Jr., Procházka, M., Klásková, E., **Zbořilová, B.**, Lubušský, M., Sobek, A. Triple pregnancy with mixed chorionicity following *in vitro* fertilization: is fetal reduction necessary? Ceska Gynekol., 2017, 82, s. 118-121.
10. Sobek, A. Jr., **Zbořilová, B.**, Procházka, M., Šilhánová, E., Koutná, O., Klásková, E., Tkadlec, E., Sobek, A. High incidence of monozygotic twinning after assisted reproduction is related to genetic information, but not to assisted reproduction technology itself. Fertil Steril., 2015, 103, p. 756-760.
11. Sobek A Jr, **Hladíková B**, Koutná O, Kučerová L, Dostálová Z, Sobek A. Prevalence of Chlamydia trachomatis infection in patients treated for infertility. Ceska Gynekol., 2012, 77, p. 476-479.
12. Sobek A Jr, Tkadlec E, **Hladíková B**, Sobek A. Is there a declining trend in ovarian function among infertility clinic patients? Hum Reprod., 2010, 25, p. 127-132.
13. Sobek, A. Jr., Vodicka, J., **Hladíková, B.**, Tkadlec, E., Sobek, A. The age of women treated for infertility increases.Ceska Gynekol., 2008, 73, p. 227-30.
14. Zbořil, J., **Hladíková, B.**, Tkadlec, E. 2007. Populační dynamika zajíce polního na Olomoucku [Brown Hare (*Lepus europaeus*) population dynamics in central Moravia (Czech Republic)]. Lynx (Praha), n. s., 38, p. 89–97.

15. **Zbořilová, B.**, Oborná, I., Tkadlec, E., Procházka, M., Březinová, J., Sobek, A. Jr., Sobek, A. Ovlivňuje použití transferového média EmbryoGlue úspěšnost embryotransferu? Ceska Gynekol., 2018, In press.
16. **Zbořilová, B.**, Tkadlec, E., Březinová, J., Procházka, M., Oborná, I., Sobek, A. Jr., Sobek, A. Hladina hCG po embryotransferu jako prognostický ukazatel fyziologického těhotenství. Ceska Gynekol., 2018, In press.

Postery:

1. Jaworek, H., Oborna, I., **Zborilova, B.**, Brezinova, J., Ruzickova, D., Koudelakova, V., Vrbkova, J., Hajdich, M. Prevalence of HPV Infection in Potential Sperm Donors and in Men from Infertile Couples in the Czech Republic. 1.-4.7.2018, Annual Meeting ESHRE, Barcelona.
1. Hlinka, D., Kalatova, B., Vybiralova, K., Svobodova, L., **Zborilova, B.**, Lazarovska, S. Mitotic pulses and cell apoptosis are the two major factors contributing to collapse of blastocoel cavity. 2.-5. 7. 2017, Annual Meeting ESHRE, Geneva.
2. Klasková, E., Tüdös, Z., Sobek, A., Dostal, J., Prochazka, M., **Zborilová, B.**, Sobek, A. Jr., Dostalova, Z., Zapletalova, J. Mosaicism up to 10% of Aneuploidy in Women Undergoing IVF Procedure Seems Not To Be Associated with a Higher Prevalence of Congenital Cardiovascular Disease and Thoracic Aorta Dilatation: a Prospective Cardiovascular Magnetic Resonance Study, 18th World Congress on Controversies in Obstetrics, 2013, Gynecology & Infertility (COGI), Vienna, Austria, p. 17-21.
3. Novotný, J., Březinová, J., Řeřuchová, M., Filipčíková, R., **Zbořilová, B.**, Oborná, I. Hodnocení viability spermií pomocí flow citometru. 13.-14. 11. 2012, 11. česko-slovenská konference Reprodukční gynekologie a 22. symposium Asistované reprodukce, Brno.

4. Ondryasova, H., **Zborilova, B.**, Koudelakova, V., Oborna, I., Brezinova, J., Vrbkova, J., Hajduch, M. Prevalence of HPV infection in oocyte donors and women treated for infertility: a prospective study. 14.-16. 7. 2015, Annual Meeting ESHRE, Lisabon.
5. Sobek A. Jr., **Hladíková, B.**, Koutná, O., Dostálová, Z., Sobek, A. Výskyt Chlamydia Trachomatis při léčbě neplodnosti. 8.-9. 11. 2011, 10. česko-slovenská konference Reprodukční gynekologie a 21. symposium Asistované reprodukce, Brno.
6. Sobek, A., **Zborilova, B.**, Sobek, A. Jr., Holub, P., Klasková, E., Prochazka, M., Marik, T. Treatment of low oocyte quality in the Czech Republic. 7.-10.3.2018, The 18 world congress ISGA, Florence, Italy.
7. Sobek A. Jr., **Zbořilová, B.**, Koutná, O., Dostálová, Z., Sobek, A. Young women with good ovarian function and a family record of monozygotic twins are at a high risk of monozygotic twinning after ART. 14.-16. 7. 2015, Annual Meeting ESHRE, Lisabon.
8. **Zbořilová, B.**, Ondryášová, H., Oborná, I., J. Novotný, J., Březinová, J., Filipčíková, R., Hubáček, P., Hajdúch, M., Sobek, A. Jr., Bakaj, T., J. Heřman, J. HPV a poruchy plodnosti. 11.-12. 11. 2014, 13. česko-slovenská konference Reprodukční gynekologie a 24. symposium Asistované reprodukce, Brno. (Cena za nejlepší poster konference)
9. **Zbořilová, B.**, Sobek A. Jr., Koutná, O., Dostálová, Z., Sobek, Prognóza výsledku těhotenství po IVF a ET z hladiny hCG. 13.-14. 11. 2012, 11. česko-slovenská konference Reprodukční gynekologie a 22. symposium Asistované reprodukce, Brno.

Přednášky:

1. Březinová J., Ondryášová H., **Zbořilová B.**, Doležal R. J., Hoňková B., Růžičková D., Koudeláková V., Hajduch M., Sobek A., Filipčíková, Oborná I. Výskyt HPV infekce u mužů z neplodných párů a potenciálních dárců spermií. 14. česko-slovenská konference Reprodukční gynekologie a 25. Symposium asistované reprodukce, 10.-11. 11. 2015, Brno.

2. Hlinka D., Lazarovská S., Kalátová B., Hamplová I., Langerová K., Choma J., Blažek A., Borovec J., **Zbořilová B.** Automatizovaná analýza time-lapse záznamov pomocou kognitívnych programov a neurónovej siete IBM. 14. česko-slovenská konferencie Reprodukční gynekologie a 25. Symposium asistované reprodukce, 10.-11. 11. 2015, Brno.
3. Sobek A. Jr., **Zbořilová B.**, Procházka M., Koutná O., Klásková E., Tkadlec E., Sobek A. Zvýšený výskyt monozygotních dvojčat v léčbě neplodnosti může souviset s dědičností. 14. česko-slovenská konferencie Reprodukční gynekologie a 25. Symposium asistované reprodukce, 10.-11. 11. 2015, Brno.
4. Sobek A. jr., **Zbořilová B.**, Procházka M., Koutná O., Klásková E., Tkadlec E., Sobek A. Zvýšený výskyt monozygotních dvojčat v léčbě neplodnosti může souviset s dědičností. 14. česko-slovenská konferencie Reprodukční gynekologie a 25. Symposium asistované reprodukce, 10.-11. 11. 2015, Brno.
5. **Zborilova, B.**, Fingerová, H., Oborna, I., H., Brezinova, J., Filipcikova, R., Sobek, A. Prognosis of pregnancy outcome after IVF + ET based on HCG levels between the 12 th and 17 th day after transfer“ v Žďáru nad Sázavou na XVIII. Symposium imunologie a biologie reprodukce, Žďár nad Sázavou.
6. **Zborilova, B.**, Oborna, I., Ondryasova, H., Brezinova, J., Filipcikova, R., Sobek, A. Prevalence of HPV Infection and Assisted Reproduction. XXI. Symposium imunologie a biologie reprodukce 14.-16. 5. 2015, Třešť.
7. **Zbořilová, B.**, Ondryášová, H., Březinová, J., Filipčíková, R., Oborná, I. Výskyt HPV a asistovaná reprodukce. Konferencie Bardošův memorial, 18. 3. 2015, Bratislava, Slovensko.
8. **Zbořilová, B.**, Kocur, T. Embryologie. Přednáška předmět C, LF UPOL, 30. 3. 2016, Olomouc.

9. **Zbořilová, B.**, Kocur, T. Embryologie. Přednáška předmět C, LF UPOL, 22. 3. 2017, Olomouc.

10. **Zbořilová, B.**, Kocur, T. Embryologie. Přednáška předmět C, LF UPOL, 14. 3. 2018, Olomouc.

#### Granty:

Uspěšně podala ve studentské grantové soutěži roční projekt: HPV a poruchy plodnosti.

Datum trvání od 1. 3. 2014 do 28. 2. 2015. Řešitel projektu: **RNDr. Blažena Zbořilová**

Číslo projektu: IGA\_LF\_2014\_009

## 14 Přílohy

Příloha 1: **Zbořilová, B.**, Oborná, I., Tkadlec, E., Procházka, M., Březinová, J., Sobek, A. Jr., Sobek, A. Ovlivňuje použití transferového média EmbryoGlue úspěšnost embryotransferu? Ceska Gynekol., 2018, In press.

Příloha 2: **Zbořilová, B.**, Tkadlec, E., Březinová, J., Procházka, M., Oborná, I., Sobek, A. Jr., Sobek, A. Hladina hCG po embryotransferu jako prognostický ukazatel fyziologického těhotenství. Ceska Gynekol., 2018, In press.

Příloha 3: Sobek, A. Jr., **Zbořilová, B.**, Procházka, M., Šilhánová, E., Koutná, O., Klásková, E., Tkadlec, E., Sobek, A. High incidence of monozygotic twinning after assisted reproduction is related to genetic information, but not to assisted reproduction technology itself. Fertil Steril., 2015, 103, p. 756-760.

Příloha 4: Sobek A Jr, Tkadlec E, **Hladíková B**, Sobek A. Is there a declining trend in ovarian function among infertility clinic patients? Hum Reprod., 2010, 25, p. 127-132.

Příloha 5: Sobek, A. Jr., Vodicka, J., **Hladíková, B.**, Tkadlec, E., Sobek, A. Věk žen podstupujících léčbu neplodnosti roste. Ceska Gynekol., 2008, 73, p. 227-30.

Příloha 6: Sobek A Jr, **Hladíková B**, Koutná O, Kučerová L, Dostálová Z, Sobek A. Výskyt *Chlamydia trachomatis* při léčbě neplodnosti. Ceska Gynekol., 2012, 77, p. 476-479.

Příloha 7: Grant: HPV a poruchy plodnosti. Datum trvání od 1. 3. 2014 do 28. 2. 2015.

Řešitel projektu: **RNDr. Blažena Zbořilová**, IGA\_LF\_2014\_009.

## **Příloha 1**

Vymezení mého podílu práce: V této práci jsem prováděla polovinu laboratorních metod asistované reprodukce, navrhla studii, kompletně připravila data a napsala jsem první draft článku.

## **Příloha 2**

Vymezení mého podílu práce: V této práci jsem prováděla polovinu laboratorních metod asistované reprodukce, kompletně připravila data a napsala jsem první draft článku.



### **Příloha 3**

Vymezení mého podílu práce: V této práci jsem prováděla polovinu laboratorních metod asistované reprodukce, kompletní přípravu a vyhledávání dat a podílela jsem se na psaní článku.

## **Příloha 4**

Vymezení mého podílu práce: V této práci jsem prováděla polovinu laboratorních metod asistované reprodukce, kompletní přípravu a vyhledávání dat a podílela jsem se na psaní článku.

## **Příloha 5**

Vymezení mého podílu práce: V této práci jsem prováděla polovinu laboratorních metod asistované reprodukce, kompletní přípravu a vyhledávání dat a podílela jsem se na psaní článku.

## **Příloha 6**

Vymezení mého podílu práce: V této práci jsem prováděla stanovení *CHT* metodou PCR, kompletní přípravu a vyhledávání dat a podílela jsem se na psaní článku.

## **Příloha 7**

Vymezení mého podílu práce: V této práci jsem navrhla studii, kompletně připravila data a podala grant (hlavní řešitel), dále jsem odprezentovala výsledky na několika konferencích.