

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ

Přírodovědecká fakulta  
Katedra biologie

**Využití „time-lapse“ monitoringu v hodnocení vývoje  
lidských embryí**

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých při zpracování bylo čerpáno, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 15.2.2023

RNDr. Kateřina Tvrdoňová



## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. a odborné konzultantce RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za jejich rady a názory, které byly podstatné pro dokončení disertační práce.

Chtěla bych poděkovat RNDr. Alici Malenovské, zkušené klinické embryoložce, za její odborné rady a doporučení a také za podporu po celou dobu mého profesního života.

Dále bych ráda poděkovala řediteli Kliniky reprodukční medicíny a gynekologie Zlín MUDr. Davidovi Rumpíkovi, Ph.D. za poskytnutí možnosti provádět výzkum v oblasti morfokinetiky lidských embryí přímo na mém domácím pracovišti.

Děkuji Mgr. Silvii Bělaškové, Ph.D. za statistické zpracování souboru a vyhodnocení výsledků.

Na závěr můj dík náleží mé rodině za podporu a trpělivost

## Abstrakt

**Úvod** Vybrat jen jedno nejlepší embryo k embryotransferu (ET) je jeden z nejdůležitějších kroků celé IVF léčby. V současné době je jednou z nejefektivnějších metod, co se týče selekce embrya s největším implantačním potenciálem, metoda preimplantačního genetického testování (PGT). Je to invazivní metoda, u které je ke genetickému vyšetření třeba odebrat několik buněk trofektodermu (TE) embrya. Výsledky preimplantačního genetického testování mohou rozhodování o nejlepším embryu značně usnadnit. Alternativní cestou k výběru embrya s vysokým implantačním potenciálem je kultivace embryí v time-lapse kultivačním systému, který může nabídnout řadu prediktivních parametrů užitečných při výběru embrya. Neinvazivní time-lapse monitoring lze používat k selekci kvalitních embryí s vysokým implantačním potenciálem za stabilních kultivačních podmínek. Embryo k elektivnímu single embryotransferu (eSET) je pak možné vybrat na základě zjištěných morfokinetických parametrů a morfologických znaků, které dle výsledků této práce predikují vyšší implantační potenciál.

**Metody** Do této retrospektivní kohortové studie bylo zahrnuto celkem 1027 morfologicky kvalitních embryí (552 geneticky normálních a 475 geneticky abnormálních embryí) od 296 pacientek, které se v období od ledna 2016 do června 2021 léčily na Klinice reprodukční medicíny a gynekologie ve Zlíně. Všechna embrya byla kultivována v time-lapse inkubátoru EmbryoScope a v průběhu kultivace byly odečteny jejich morfokinetické parametry a morfokinetické znaky. Na závěr kultivace (pátý nebo šestý den kultivace) byl proveden odběr buněk trofektodermu embryí a následně genetické vyšetření bioptovaných buněk. Všechna bioptovaná embrya byla kryokonzervována (vitifikace) a v následujícím menstruačním cyklu bylo zavedeno jedno rozmražené geneticky normální embryo pacientce do dělohy.

**Výsledky** Byly nalezeny signifikantní rozdíly u morfokinetických parametrů cc2, t5, tSB a ve výskytu multinukleací ve dvoubuněčném a čtyřbuněčném stadiu embryí mezi skupinou geneticky normálních embryí a geneticky abnormálních embryí. Zároveň byl zjištěn signifikantní rozdíl u morfologických parametrů cc2, t5, tSB a výskytem multinukleací ve dvoubuněčném a čtyřbuněčném stadiu embryí mezi skupinou geneticky normálních embryí, které po kryoembryotransferu vedly ke klinické graviditě a skupinou abnormálních embryí.

Porovnáním skupiny geneticky normálních embryí, které po kryoembryotransferu vedly ke vzniku klinické gravidity, a skupiny geneticky normálních embryí, kde byl těhotenský test 14 dní po kryoembryotransferu negativní, byly zjištěny signifikantní rozdíly u parametru tSB a t5. Morfokinetické parametry zjištěné u skupiny geneticky normálních embryí, které vedly po zavedení do dělohy ke vzniku klinické gravidity, byly použity pro stanovení časových intervalů, které by měly predikovat embrya s vysokým implantačním potenciálem. Zároveň byl navržen hierarchický model k selekci embryí s vysokým implantačním potenciálem.

Celkem 218 geneticky normálních embryí bylo po rozmrazení pacientkám zavedeno do dělohy – single kryoembryotransfer – u 119 (54,6 %) byla potvrzena klinická gravidita s akcí srdeční u plodu. Naše výsledky ukazují, že dle morfokinetických parametrů (cc2, t5, tSB) a výskytu multinukleací během prvních dvou buněčných dělení lze s vysokou pravděpodobností vybrat pro embryotransfer to nejlepší embryo.

Vzhledem k tomu, že preimplantační genetické testování je stále metodou první volby pro stanovení aneuploidí, tak morfokinetické parametry a markery euploidního embrya by mohly být využívány zejména u pacientů, kteří nejsou indikováni k PGT, odmítají invazivní PGT vyšetření nebo kteří z jakýchkoli právních, sociálních nebo ekonomických důvodů si nepřejí nebo nemohou nechat provést PGT.

**Klíčová slova** time-lapse monitoring, morfokinetické parametry, multinukleace, vývoj embryí, preimplantační genetické testování

## Abstract

**Introduction** The selection of the best embryo for embryotransfer (ET) is one of the most important steps in the whole IVF treatment. Currently, one of the most effective methods for selecting the embryo with the greatest implantation potential is the preimplantation genetic testing (PGT). It is an invasive method in which several cells of the embryo's trophectoderm (TE) must be removed for genetic testing. The results of preimplantation genetic testing can greatly facilitate the decision on the best embryo. An alternative way to select an embryo with high implantation potential is to cultivate the embryos in a time-lapse culture system that can offer a number of predictive parameters. Non-invasive time-lapse monitoring can be used to select quality embryos with high implantation potential under stable culture conditions. The embryo for elective single embryotransfer (eSET) can then be selected on the basis of the identified morphokinetic parameters and morphological features, which according to the results of this work predict a higher implantation potential.

**Methods** This retrospective cohort study included a total of 1,027 morphologically high-quality embryos (552 genetically normal and 475 genetically abnormal embryos) from 296 patients who were treated at the Department of Reproductive Medicine and Gynecology in Zlín between January 2016 and June 2021. All embryos were cultured in an EmbryoScope time-lapse incubator, and their morphokinetic parameters and morphokinetic characteristics were read during cultivation. At the end of the cultivation (the fifth or sixth day of cultivation), the cells of the embryo's trophectoderm were collected and subsequently genetically examined the biopsied cells. All biopsied embryos were cryopreserved (vitrification) and one genetically normal embryo was introduced into the patient's uterus in the following menstrual cycle.

**Results** Significant differences were found in the morphological parameters cc2, t5, tSB and the incidence multinucleations of stage 2bb and 4bb embryos between the group of genetically normal embryos and genetically abnormal embryos. At the same time, a significant differences in the morphological parameters cc2, t5, tSB and the occurrence of multinucleations in the two-cell and four-cell embryo stage were found between the group of genetically normal embryos that led to clinical pregnancy after ET and the group of abnormal after cryoembryotransfer. A comparison of the group of genetically normal embryos that led

to clinical pregnancy after cryoembryotransfer and the group of genetically normal embryos where the pregnancy test was negative 14 days after frozen embryotransfer showed significant differences in the parameters tSB and t5. The morphokinetic parameters found in the group of genetically normal embryos that led to the clinical pregnancy were used to determine the time intervals that should predict embryos with high implantation potential. At the same time, a hierarchical model for the selection of embryos with high implantation potential was proposed.

A total of 218 euploid embryos were introduced into the uterus after thawing - single frozen embryotransfer - 119 (54.6 %) confirmed clinical pregnancy with heart beat in the fetus. Our results show that according to morphokinetic parameters (cc2, t5, tSB) and the occurrence of multinucleations during the first two cell divisions, the best embryo can be selected with high probability for embryotransfer.

As preimplantation genetic testing is still the method of choice for the determination of aneuploidies, the morphokinetic parameters and markers of the euploid embryo could be used especially in patients who are not indicated for PGT, refuse invasive PGT examination or who of any for legal, social or economic reasons, they do not wish or cannot have PGT carried out.

**Keywords** time-lapse monitoring, morphokinetics, multinucleation, embryo development, preimplantation genetic testing

# Obsah

	Terminologický slovník.....	9
	Seznam zkratk.....	15
1	Úvod.....	18
2	Cíle práce.....	20
3	Teoretická část.....	21
3.1	Poruchy plodnosti u žen.....	21
3.2	Poruchy plodnosti u mužů.....	24
3.3	Metody asistované reprodukce.....	28
3.3.1	Stimulace vaječnicků.....	29
3.3.2	Intrauterinní inseminace.....	32
3.3.3	<i>In vitro</i> fertilizace a embryotransfer .....	33
4	Materiál a metodika.....	59
4.1	Soubor pacientek.....	59
4.2	Odběr a kultivace oocytů a embryí.....	59
4.3	Biopsie buněk trofektodermu.....	60
4.4	Genetické vyšetření.....	62
4.5	Time-lapse monitoring .....	62
4.6	Kryoembryotransfer.....	63
4.7	Statistická analýza.....	64
5	Výsledky.....	66
6	Diskuze.....	75
7	Závěr.....	82
8	Seznam použité literatury.....	84
9	Celkový seznam publikovaných prací autorky.....	99
10	Přílohy.....	101

## Terminologický slovník

agalakcie	neschopnost mléčné žlázy vylučovat mateřské mléko
agonisté GnRH	superaktivní analoga GnRH
amenorea	úplná absence menstruace po dobu nejméně tří až šesti měsíců
aneuploidie	chybění nebo nadbytek chromozomů ve všech buňkách organismu
analoga GnRH	uměle připravené látky (léčivé přípravky), které mají podobný účinek jako přirozeně se vyskytující GnRH
anovulace	porucha, kdy během menstruačního cyklu nedochází k uvolnění zralého vajíčka z vaječníků
androgeny	mužské pohlavní hormony
anosmie	úplná ztráta čichu
antagonisté GnRH	syntetická analoga GnRH, která blokuje přímo receptory v hypofýze
asistovaný hatching	obvykle pomocí laseru se do <i>zona pellucida</i> udělá otvor, aby embryo mohlo lépe pátý nebo šestý den vývoje herniovat z tohoto obalu
atrézie	přirozený proces, při kterém zanikají folikuly ve vaječnících ženy; týká se drtivé většiny folikulů, pouze několik stovek jich dosáhne ovulace
atrofizace	úbytek živé tkáně
autokrinní	způsob vylučování látek buňkou, při němž vyloučená látka zpětně ovlivňuje buňku samu, tj. působí zpětně na receptory na téže buňce
azoospermie	nepřítomnost spermií v ejakulátu
biopsie trofektodermu	odběr několika buněk trofektodermu k vyšetření
bioptované buňky	odebrané buňky k vyšetření (genetickému)
celogenomová amplifikace	metoda, která z malého množství DNA umožní získat množství dostačující pro následné analýzy s pokrytím celého genomu

denudace	manuální očištění oocytů od buněk kumulo-oocytárního komplexu vč. <i>corona radiata</i>
dominantní folikul	největší folikul ve vaječníku z kohorty folikulů reagujících na hormonální stimulaci
dyslipidemie	abnormálně zvýšené hladiny lipoproteinů a lipidů v krvi
dysmenorea	bolest v podbříšku a další somatické příznaky (průjem, bolesti hlavy, nauzea, zvracení, kolaps) začínající těsně před menstruačním krvácením a mizí po následujících 2-3 dnech, vyskytuje se až u 50 % žen
dyspareunie	bolestivý pohlavní styk
dysurie	pálivá a řezavá bolest vycházející z močové trubice nebo jejího okolí při močení
elektivní single embryotransfer	zavedení jednoho vybraného (nejlepšího) embrya do dělohy
embolizace	částečné nebo úplné ucpání průsvitu cévy, vyřazení části krevního řečiště z krevního oběhu
embryonální mozaicismus	výskyt více řad (linií) buněk s různou dědičnou informací
embryotransfer	zavedení embrya do dělohy
endokrinní	vylučování chemických posílů (hormonů), které cirkulují v těle v krevním oběhu a ovlivňují i vzdálené orgány
endometrium	vnitřní slizniční výstelka děložní dutiny
endometrium	děložní sliznice
fertilizace oocytu	oplození vajíčka
fragmentace embrya	vytvoření cytoplazmatických útvarů bez DNA, obvykle při buněčném dělení
galaktorea	tvorba a vylučování mléka mléčnou žlázou mimo období kojení laktace
gonadoliberin	hormony produkované buňkami hypothalamu, které následně stimulují buňky adenohipofýzy k sekreci pohlavních hormonů - folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH)



gonadotropiny	jakýkoliv savčí hormon (obvykle glykoproteinové povahy), který stimuluje vývoj pohlavních orgánů (gonád)
gonádová dysgeneze	vrozená vývojová porucha gonád různé intenzity často na podkladě patologického karyotypu, manifestující se v době dospívání sexuálními infantilismem
gynekomastie	zvětšení prsní žlázy u mužů
HEPES pufr	kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová, je schopná udržovat v jistém rozmezí stabilní pH
herniace trofektodermu	vychlípění části trofektodermu embrya ven ze <i>zona pellucida</i>
hyaluronan, kyselina hyaluronová	nevětvený polysacharid, jedna z hlavních složek mezibuněčné hmoty
hybridizace DNA	vzájemné párování jednořetězcových komplementárních molekul DNA
hyperandrogenní syndrom	zdravotní stav charakterizovaný nadměrnými hladinami androgenů v ženském těle a souvisejícími účinky zvýšených hladin androgenů
hyperestrismus	zdravotní stav charakterizovaný nadměrným množstvím estrogení aktivity v těle
hyperprolaktinémie	zvýšená hladina hormonu prolaktinu v krvi
hypoblastická varlata	málo vyvinutá, malá varlata
hypospádie	vrozený rozštěp močové trubice na spodní straně penisu
hypotyreóza	snížená funkce štítné žlázy při nedostatečné sekreci tyreoidálních hormonů
chromozomální aberace	odchyly v počtu nebo tvaru chromozomů
implantace	zachycení a uchycení embrya v děloze
<i>in vitro</i> fertilizace	oplození vajíček v laboratoři, ve „zkumavce“
ingvinální kanál	tříselný kanál, štěrbina 4-5 cm dlouhá ve spodní části břišní stěny, v průběhu intrauterinního vývoje u muže sestupují ingvinálním kanálem varlata do šourku
internalizace receptoru	přesun receptoru z povrchu membrány

kapacitace spermií	proces dozrávání spermií, během kterého získávají schopnost oplodnit vajíčko
kauzální mutace	mutace, která je příčinou onemocnění
kauzální léčba	léčba zaměřená na příčinu nemoci
Klinefelterův syndrom	vzniká přítomností nadpočetného chromozomu X u muže, jedná se o gonozomální numerickou aberaci
kodominantní folikul	jeden z více folikulů v ovariu, které reagují na hormonální stimulaci a rostou
kompaktace embrya	po dosažení 9-ti a více buněčného embrya, blastomery se k sobě přimykají a vytváří kompaktní buněčnou kouli, je podmíněna adhezivními molekulami
kryoembryotransfer	zavedení rozmrazeného embrya do dělohy
kryptorchismus	nepřítomnost varlete v šourku u pacienta staršího 4 měsíců
kumulo-oocytární komplex	folikulární buňky obklopující oocyt (komplex složený ze dvou typů buněk tvořící vnitřní k oocytu naléhající <i>corona radiata</i> a vnější <i>cumulus oophorus</i> a vlastní oocyt
Leydigovy buňky	vmezeřené buňky nacházející se ve vazivových výplních mezi semenotvornými kanálky varlat, produkují pohlavní hormon testosteron
luteální fáze menstruačního cyklu	začíná dnem ovulace a končí prvním dnem menstruace, trvá 12 až 16 dní, klesá hladina estrogenu a zároveň roste hladina progesteronu, což způsobuje nárůst děložní sliznice a připravuje ji k implantaci embrya
luteální podpora	medikamentózní podpoření luteální fáze, zejména podáním progesteronu
luteinizace	přeměna zralého folikulu ve vaječniku ve žluté tělísko po ovulaci
metabolický syndrom	onemocnění, které je spojeno s obezitou, vysokým krevním tlakem, rizikem pro vznik aterosklerózy a hypercholesterolémie
metabolomika	vědní disciplína, která se zabývá analýzou (identifikací a kvantifikací) všech metabolitů v buňce

morfokinetické parametry	morfologické a vývojové parametry dělicího se preimplantačního embrya
multinukleace blastomer	vyšší počet jader v buňce časného embrya
nebalancovaná přestavba chromozomu	změna chromozomu ve smyslu chybění nebo přebývání určité části genetického materiálu, tento stav s sebou nese většinou závažné klinické důsledky
olfaktorický bulbus	část mozku obratlovců, která se vychlipuje z přední strany hemisfér koncového mozku, přichází do něj informace z čichových orgánů
osmolyt	látka podílející se na udržení osmotického tlaku
oolema	cytoplazmatická membrána vajíčka
ovariální steroidy	hormony lipofilní povahy, které vznikají z cholesterolu ve vaječnicích ženy (estrogeny, progesteron)
parakrinní	způsob vylučování, při níž buňka svými produkty s funkcí hormonů ovlivňuje buňky v bezprostředním okolí
ploidie	počet homologních sad chromozomů v jádře živé buňky
polycystická ovaria	syndrom polycystických ovarií neboli syndrom mnohočetných cyst ve vaječnicích je onemocnění, které nepostihuje jenom jeden orgán (tj. vaječníky), ale jeho projevy jsou patrné na různých místech v organismu, je definován jako onemocnění s chronickou anovulací a nadbytečnou tvorbou mužských pohlavních hormonů (androgenů) v těle pacientky
pregnancy rate	četnost těhotenství
preimplantační genetické testování	vyšetření genetické výbavy embrya (chromozomálních aberací i monogenních vad) před zavedením embrya do dělohy
proteomika	vědecká disciplína zabývající se studiem proteinů a jejich vlastností, především struktury a funkce
spermiogeneze	závěrečná vývojová etapa vyzrávání spermií
time-lapse monitoring	časově sledované snímání vyvíjejících se preimplantačních embryí
totipotentní buňky	buňky, které se mohou bez omezení přeměnit na jakýkoliv jiný typ buněk včetně totipotentní buňky

trigger	spouštěč, aplikace látky startující dozrání oocytů (např. Decapeptyl, Ovitrelle)
trofektoderm	diferencovaná část blastocysty, dávající základ placentě
tropní hormony	řídící hormony adenohypofýzy
tuba, tubární	vejcovod, vyskytující se ve vejcovodu
Turnerův syndrom	vrozené onemocnění vyskytující se u žen, jehož podstatou je absence jednoho chromozomu X
varikokéla	dilatované a stočené, varikózně změněné žíly <i>plexus pampiniformis testis</i>
varixy	„křečové žíly“, rozšířené žíly s městnající se krví, nejčastěji v oblasti dolních končetin
virilizace	rozvoj druhotných mužských pohlavních znaků u žen
vitifikace	metoda mrazení, využívá prudkého snížení teploty a tím zabrání vzniku ledových krystalů
žluté tělísko, <i>corpus luteum</i>	dočasný útvar na vaječniku, který zbude po folikulu po ovulaci a produkuje ženské pohlavní hormony

## Seznam použitých zkratek

aCGH	array komparativní genomová hybridizace (na biočipu), Array Comparative Genomic Hybridization
AMH	antimülleriánský hormon, anti-Müllerian hormone
AZF	azoospermatický faktor, azoospermia factor
B	buňka
Bb	buňky
Bp	pár bází, base pair
CC	klomifencitrát, clomifene citrate
CBAVD	vrozená bilaterální absence vas deferens, congenital bilateral absence of the vas deferens
cc2	doba mezi 1. a 2. mitózou
CFTR	regulátor transmembránové vodivosti u cystické fibrózy, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,
CGH	komparativní genomová hybridizace, Comparative Genome Hybridization
COC	kumulo-oocytární komplex, Cumulus-oocyte Complex
D0	den 0, den fertilizace oocytů
D1	první den kultivace embryí
D2, D3, D4, D5, D6	druhý, třetí, čtvrtý, pátý, šestý den kultivace embryí
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina, ethylenediaminetetraacetic acid
E2	estradiol v séru
eSET	elektivní single embryotransfer, elective single-embryo transfer
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
ET	embryotransfer
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace, fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FSH	folikulostimulační hormon, follicle-stimulating hormone
GM-SCF	granulocytární kolonie stimulující faktor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GnRH	gonadoliberin, gonadotropin-releasing hormone

H	hodin
hCH	choriový gonadotropin, human Chorionic Gonadotropin
HEPES	kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová, pufr; 2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid
hpi	hodin po provedení fertilizace oocytu, hours post insemination
hr-NGS	sekvenování nové generace s vysokým rozlišením, high resolution next generation sequencing
ICM	vnitřní masa buněk blastocysty, inner cell mass
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie, intra-cytoplasmic sperm injection
IGF	růstový faktor podobný inzulinu, Insulin Like Growth Factor
IMSI	intracytoplazmatická injekce morfologicky vybrané spermie, intra-cytoplasmic morphologically selected sperm injection
INSL3	inzulínu podobný protein 3, insulin-like factor 3
IUI	intrauterinní inseminace, intrauterine insemination
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace, <i>in vitro</i> fertilization
KET	kryoembryotransfer
LH	luteinizační hormon, luteinizing hormone
IN <sub>2</sub>	tekutý dusík, liquid nitrogen
MACS	magneticky aktivované třídění buněk, magnetic-activated cell sorting
MESA	mikrochirurgické odsátí spermií z nadvarlete, Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration
NGS	sekvenování nové generace, next generation sequencing
OHS	ovariální hyperstimulační syndrom, ovarian hyperstimulated syndrome
OPU	ovariální pick-up (punkce ovariální tekutiny, aspirace oocytů), oocyt pick-up
PCO	polycystická ovária, polycystic ovary
PCOS	syndrom polycystických ovaríí, polycystic ovary syndrom
PGT	preimplantační genetické testování, preimplantation genetic testing
PGT-A	preimplantační genetické testování aneuploidií, preimplantation genetic testing for aneuploidy
PGT-M	preimplantační genetické testování monogenních onemocnění, preimplantation genetic testing for monogenic disorders

PGT-SR	preimplantační genetické testování chromozomálních přestaveb, preimplantation genetic testing for structural rearrangements
PICSI	intracytoplazmatická injekce předem vybrané spermie, preselected intracytoplasmic sperm injection
s2	doba mezi 2. a 3. miózou
SBS	simultánní sekvenování, simultaneous bidirectional sequencing
SHBG	sexuální hormon vázající globulin, sex hormon-binding globulin
SNP	polymorfismus jediného nukleotidu, single nucleotide polymorphism,
SPG	spermiogram
t3	čas dosažení 3 buněčného stadia
t5	čas dosažení 5-ti buněčného stadia
tB	čas utvoření blastocysty
TE	trofektoderm
TESE	chirurgické získání spermií z varlete, TEsticular Sperm Extraction
tM	čas utvoření kompaktní moruly
tPNf	čas vymizení prvojader v zygotě
tSB	čas iniciace blastulace
tSC	čas iniciace kompaktace
UZ	ultrazvuk
WGA	celogenomová amplifikace, Whole Genome Amplification
ZP	<i>zona pellucida</i> , glykoproteinový obal lidského vajíčka a preimplantačního embrya

# 1 Úvod

Cílem oboru reprodukční medicíny je, aby léčený pár s různými poruchami plodnosti pomocí metod asistované reprodukce přivedl na svět zdravé dítě. V posledních dvaceti letech se tento obor intenzivně rozvíjí zejména díky nástupu moderních technologií. Dnes už je *in vitro* fertilizace (IVF) dobře zavedená reprodukční technika používaná k léčbě neplodnosti. Celá léčba je komplexní postup, který zahrnuje řadu různých kroků: stimulaci vaječnicků, zpracování ejakulátu a výběr nejkvalitnějších spermií k fertilizaci oocytů, odběr a vlastní oplodnění oocytů, kultivaci embryí a výběr obvykle jednoho embrya k embryotransferu, vlastní přenos embryí, kryokonzervaci nadpočetných embryí, luteální podporu. Úspěch celé léčby závisí na mnoha faktorech, jmenovitě na stavu embrya (genetický komplement), vnímavosti endometria pacientky a adekvátní technice přenosu embrya (Řezáčová *et al.*, 2018). Bohužel, vysoký podíl embryí může být aneuploidní a jejich přenos bývá spojen se sníženou mírou implantace, vysokou mírou potratů a sníženou mírou porodu živého dítěte. Aby se obešla vysoká míra aneuploidie embryí a zvýšila úspěšnost léčby, bylo donedávna přenášeno více embryí s cílem dosáhnout porodu alespoň jednoho živého dítěte. Tato praxe byla ovšem spojena s vysokou mírou vícečetných těhotenství, která s sebou nesla řadu rizik pro zdraví matky i plodu. Kvůli této hlavní nevýhodě byly vyvinuty techniky selekce embryí pro výběr jednoho nejlepšího embrya pro přenos do dělohy (Řezáčová *et al.*, 2018).

Vyselektovat to pravé embryo pro embryotransfer je dlouholetou snahou IVF specialistů. Dnes se již ve většině případů transferuje jen jedno nejlepší embryo (elektivní single embryotransfer, eSET) s cílem vyvarovat se nežádoucí vícečetné graviditě (Gardner *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2010). Výběr kvalitních embryí lze provádět pomocí invazivních nebo neinvazivních technologií. Mezi neinvazivní metody je zařazeno hodnocení morfologie embryí, time-lapse monitoring embryí, metabolomika a proteomika vyvíjejících se lidských embryí. Invazivní techniky zahrnují zejména biopsii buněk trofektodermu embrya pro genetické testování (Zaninovic *et al.*, 2017).

Jedním z významných ukazatelů kvality embrya jsou jeho morfologické parametry. Hodnocení pouze morfologie preimplantačního embrya je subjektivní a může být zavádějící (Capalbo *et al.*, 2014). Díky time-lapse inkubátorům je možné tyto a další parametry hodnotit bez exponování vyvíjejících se embryí podmínkám mimo kultivační box, kde mají ideální



prostředí pro svůj vývoj (Wong *et al.*, 2013; Desai *et al.*, 2014). Díky této technologii je možné hodnotit embrya kontinuálně, protože snímky jsou pořizovány vždy v několikaminutových intervalech (Wong *et al.*, 2010; Meseguer *et al.*, 2011). Kontinuální kultivační time-lapse systémy byly označeny jako bezpečné pro kultivaci embryí (Cruz *et al.*, 2012) a potenciálně vytvářejí kultivační prostředí vedoucí ke zvýšené tvorbě blastocyst (Zhang *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2012) a vyšší míře implantace embrya a klinické gravidity (Cruz *et al.*, 2012; Kirkegaard *et al.*, 2012; Meseguer *et al.*, 2012). Díky kultivaci embryí v time-lapse kultivačních boxech lze získat velmi cenné informace o morfokinetice embrya a dalších vývojových markerech, např. fragmentaci a multinukleacích (Ergin *et al.*, 2014), které při běžné kultivaci s hodnocením pod laboratorním mikroskopem ve 24- hodinových intervalech lze zaregistrovat spíše výjimečně.

Vzhledem k tomu, že aneuploidie jsou u lidí nejčastější genetickou abnormalitou a více než 50 % embryí vzniklých v programu IVF je aneuploidních (Fragouli *et al.*, 2013; Franasiak *et al.*, 2014), je preimplantační genetické testování aneuploidii (PGT-A) dnes již velmi dobře zavedenou technikou. V posledních 15 letech byly implementovány nové technologie založené na celogenomové amplifikaci, mezi něž patří komparativní genomová hybridizace (CGH) nebo sekvenování nové generace (NGS). Tyto metody rozšířily možnosti genetického testování aneuploidii embryí, zejména se zvýšila schopnost zachytit embryonální mozaicismus (Hulten *et al.*, 2013; McPadden *et al.*, 2015). Právě díky PGT-A, kterým determinujeme ploidii embryí, je možné zvýšit úspěšnost IVF léčby (Forman *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013). S implementací biopsie trofektodermu (TE) blastocysty (ne pouze jedné či dvou blastomer z osmibuněčného embrya třetí den vývoje embrya) v IVF léčebných cyklech s PGT-A pomocí celogenomové amplifikace byl zaznamenán vyšší počet těhotenství, zejména když byl realizován kryoembryotransfer (KET) vitrifikovaného (a následně rozmraženého) vyšetřeného embrya ve srovnání s transferem čerstvého embrya šestý den kultivace (Coates *et al.*, 2017).

## 2 Cíle práce

Tato disertační práce je zaměřena na posouzení významu hodnocení výskytu morfologických znaků a morfokinetických parametrů vyvíjejících se preimplantačních lidských embryí.

Cílem práce bylo zjistit, zda existuje významná souvislost mezi genetickým nálezem po PGT-A vyšetření lidských embryí (geneticky normální a geneticky abnormální embrya), morfokinetickými parametry a výskytem morfologických znaků (multinukleace ve 2buněčném a 4buněčném stadiu vývoje embrya) u embryí kultivovaných v time-lapse systému. Na základě všech získaných dat bylo další snahou zjistit, zda existuje významná souvislost mezi morfokinetickými parametry a výskytem multinukleací u skupiny geneticky normálních embryí, které vedly po následujícím kryoembryotransferu vyšetřeného embrya ke klinické graviditě, a u skupiny geneticky abnormálních embryí. Na závěr byly porovnány výsledky u skupiny geneticky normálních embryí s dosaženou klinickou graviditou po KET a u skupiny geneticky normální embryí s negativním těhotenským testem po KET s cílem objevit signifikantní rozdíly u některých sledovaných parametrů. Na závěr na základě nalezených souvislostí bylo cílem navrhnout časové intervaly u sledovaných morfokinetických parametrů, které by identifikovaly potenciálně kvalitní embryo, případně navrhnout algoritmus k použití konkrétních morfokinetických parametrů k vyselektování embrya s vysokým implantačním potenciálem ke KET u pacientů, kteří nechtějí nebo nemohou podstoupit PGT-A.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Poruchy plodnosti u žen

Důležitým předpokladem otěhotnění a donošení zdravého dítěte je správná funkce reprodukčních orgánů ženy. Jejich aktivita je rozdílná v jednotlivých obdobích života. Na řízení reprodukce se podílí parakrinní, autokrinní, endokrinní, nervový a imunitní systém. Narušení těchto systémů na jakékoli úrovni může vést k poruchám plodnosti (Crha, 2018).

Sterilita je komplex nemocí, které mají řadu medicínských, psychosociálních a ekonomických aspektů. Podstatné je, že při neplodnosti je vždy léčen celý pár, tedy muž a žena. Příčina sterility se obvykle udává ve 35 % - 45 % na straně ženy, ve 30 % - 40 % na straně muže, u 20 % párů je příčina u obou současně a u 10 % párů se příčina neplodnosti nepodaří vůbec zjistit (tzv. idiopatická sterilita) (Řežábek, 2014).

Nejčastějším důvodem sterility u žen je anovulace, která tvoří až 25 % poruch plodnosti a často se projevuje poruchami menstruačního cyklu. Anovulace je častá zejména u žen, které odkládají reprodukci až do vyššího reprodukčního věku (nad 35 let), přičemž maximum plodnosti u ženy je okolo 24 let. Mezi další poruchy menstruačního cyklu, které stojí za problémy s otěhotněním, je zařazena polymenorea, která je definována jako menstruační krvácení častější než po 22 dnech. Oligomenorea je prodloužení menstruačního cyklu nad 35 dní, hypomenorea je charakteristická velmi slabým menstruačním krvácením. Hypermenorea je nadměrně silné menstruační krvácení, metroragie je nepravidelné děložní krvácení a amenorea se vyznačuje úplnou nepřítomností menstruačního krvácení (Fajt, 2018).

K dalším poruchám plodnosti u žen jsou řazeny poruchy psychogenní, které mohou vzniknout například po psychickém šoku či déletrvajícím extrémním psychickém vypětí. Zajímavé je, že také urputná snaha o otěhotnění může způsobit psychogenní sterilitu. K poruchám menstruačního cyklu může vést také nadměrné užívání alkoholu a kouření (Čepický, 1999).

Mezi další faktory, které mohou způsobit poruchy plodnosti u žen, jsou poruchy hypotalamické. Hlavním regulátorem funkce hypotalamo-hypofyzárního systému je gonadoliberin (GnRH), který je uvolňován v pulsech v pravidelných intervalech (cca 1 hodina) a tím reguluje syntézu, uskladnění a uvolnění gonadotropních hormonů hypofýzy. Narušení

těchto pulsů vede k utlumení až zastavení účinku GnRH (Liu *et al.*, 1984). Každé onemocnění centrálního nervového systému, které je asociováno s hypotalamo-hypofyzárním systémem neuronů a neurotransmiterů, může vést k narušení gonadální funkce. Nejčastější příčinou poruchy hypotalamu je funkční hypotalamická amenorea, jejíž příčinou je obvykle silná fyzická zátěž, prudký úbytek hmotnosti a psychoemociální stres. Některé pacientky mají diagnostikovaný Kallmanův syndrom, který je charakterizovaný anosmií a deficitem gonadotropinů s nedostatečným vývojem pohlavních žláz (hypogonadotropní hypogonadismus). Kallmanův syndrom je způsoben mutací několika genů, dědičnost bývá obvykle autozomálně dominantní. Porušena je tvorba a migrace neuronů tvořících GnRH spolu s agenezí olfaktorického bulbu (Poršová – Dutoit, 1996).

Poruchy hypofýzy jsou charakteristické buď nedostatkem všech jejích hormonů, které se projevují agalaktií (neschopnost mléčné žlázy vylučovat mateřské mléko), amenoreou, apatií, genitální atrofií či ztrátou ochlupení nebo hypersekrecí tropních hormonů, která může být způsobena vznikem tumoru hypofýzy (adenomu). K poruchám hypofýzy je řazena také hyperprolaktinémie projevující se zejména oligomenoreou až amenoreou nebo galaktoreou (Speroff & Fritz, 2011).

Důvodem sterility může být luteální insuficience, která je typická nedostatečnou produkcí progesteronu zejména kvůli poruchám tvorby *corpus luteum* – žlutého tělíska. Příčinou jsou obvykle odchylky v hormonální sekreci ve folikulární fázi menstruačního cyklu, přičemž měřitelnou změnou je nízký poměr folikulostimulačního hormonu (FSH) ku luteinizačnímu hormonu (LH) v časně folikulární fázi cyklu, změny frekvence pulzů LH a nízké hladiny estradiolu. Nedostatečná koncentrace progesteronu pak vede k abnormalitám endometria a je spojena s potrácením v prvním trimestru gravidity (Speroff & Fritz, 2011).

Hyperandrogenní syndrom se označuje také jako syndrom polycystických ovarií (PCO syndrom, PCOS) a je nejčastější příčinou poruch menstruačního cyklu a anovulační sterility. Hormonálně jde o kombinaci hyperandrogenního stavu, hyperestrinismu a anovulační sterility, je doprovázen inzulínovou rezistencí a následným rozvojem metabolického syndromu. Vyskytuje se až u 30 % žen v reprodukčním věku. Etiopatologie tohoto syndromu není dodnes zcela jasná, chyba je zřejmě v oblasti řízení rekrutace dominantního folikulu (Speroff & Fritz, 2011). Androgeny jsou normálně tvořeny v malých množstvích ve vaječnících a nadledvinách. I jejich malá nadprodukce může vést k takovým příznakům jako

je hirsutismus, tj. růst ochlupení v oblastech jako jsou tváře a hrudník. Při vystupňované tvorbě androgenů vedou k virilizaci – vývoji mužského charakteru, např. k hlubokému hlasu, mužskému typu ochlupení a plešatosti. Hormonální nerovnováha při PCOS také postihuje menstruační cyklus a způsobuje neplodnost. Většina žen s tímto syndromem nemá pravidelné menstruační krvácení, často u nich nedochází k ovulaci a trpí amenoreou. Jiné mají menstruační cyklus, ale nepravidelný, nebo se zvýšeným děložním krvácením. Při syndromu PCOS se oba vaječníky zvětšují až do trojnásobku jejich běžné velikosti. U 90 % žen s PCOS se při ultrazvukovém vyšetření zjistí na povrchu ovarií cysty – folikuly s nezralými vajíčky. Tyto cysty jsou často seřazeny takovým způsobem, že dělají dojem „perlového náhrdelníku“. Když vajíčko nedozraje a neuvolní se z vaječníku, nevytvoří se ve vaječníku dostatek progesteronu. To pak vytváří situaci hormonální nerovnováhy, kdy vliv estrogenů není progesteronem vyrovnáván. To může vést k přerůstání děložní sliznice – endometriální hyperplazii, což zvyšuje riziko vývoje děložní rakoviny. Pokud ženy se syndromem PCOS, kde je ještě zachovaná ovulace, otěhotní, mají zvýšené riziko potratů (Vrbíková, 2017).

I když příčina PCOS není plně objasněna, panuje domněnka, že klíčovým faktorem je inzulinová rezistence. Inzulín je rozhodujícím činitelem pro transport a využití krevního cukru na buněčné úrovni. Pomáhá v regulaci krevního cukru a má svou úlohu v metabolismu uhlovodíků a tuků. Dojde-li na buněčné úrovni k rezistenci na účinek inzulínu, organismus se s tím snaží vyrovnat zvýšením tvorby inzulínu. Tím dochází k zvýšeným hladinám inzulínu v krevním oběhu – hyperinzulinemii. Podle některých názorů je hyperinzulinemie při nejmenším jednou z příčin zvýšené tvorby androgenů vaječníky. U většiny žen s PCOS je inzulinová rezistence v různém stupni přítomna. Současně s tím je přítomna i obezita a dyslipidemie. Inzulinová rezistence je více vyjádřena u obézních žen s nepřítomnou ovulací. Důsledkem těchto metabolických změn je u PCOS zvýšené riziko vzniku *diabetes mellitus* 2. typu a kardiovaskulárního postižení (Palomba *et al.*, 2015).

Mezi poruchy gonádové se řadí gonádové dysgeneze, kdy jsou gonády nahrazeny vazivovými pruhy při normálním karyotypu nebo při Turnerově syndromu. Ten je jako jediná vitální monosomie prezentován genotypem 45, X0 nebo mozaikou 45, X0 / 46, XX. Do skupiny gonádových poruch je řazen i syndrom předčasného ovariálního selhání, který se v ženské populaci vyskytuje až s 3 % incidencí, a je častou příčinou primární i sekundární amenorey.

Jediným diagnostickým kritériem je zvýšená hladina bazálního FSH nad 40 IU/l ve věku do 40 let. Nejčastější příčinou je pravděpodobně autoimunitní poškození folikulárního aparátu (Cibula & Živný, 2000).

Poruchy štítné žlázy jsou u žen nejčastější endokrinologickou poruchou spojenou s poruchami plodnosti. Jsou diagnostikovány až u 25 % neplodných žen a u 15 % žen s poruchami menstruačního cyklu. Nejčastější příčinou hypotyreózy v reprodukčním věku je autoimunitní poškození štítné žlázy (Hollowell *et al.*, 2002). Ženy s touto endokrinní poruchou mají obvykle i poruchy menstruačního cyklu. Je u nich také dokázán vyšší počet spontánních potratů, zejména v prvním trimestru těhotenství. Hypertyreóza je spojena se zvýšenou hladinou gonadotropinů, estrogenů, androgenů, SHBG (sexuální hormony vázající globulin) a nízkou hladinou progesteronu. U hypotyreózy i subklinická hypofunkce štítné žlázy může vést k poklesu koncentrace gonadotropinů, k vzestupu prolaktinu a následnému poklesu produkce ovariálních steroidů. Hypotyreóza je spojena s poruchami jako menoragie či oligomenorea s anovulací (Saksun & Ostró, 2009).

Endometrióza je onemocnění, které také způsobuje ženskou neplodnost. Je charakterizována přítomností endometriálních buněk mimo děložní dutinu. Základní symptomy endometriózy jsou: dysmenorea (bolestivá menstruace), dyspareunie (bolestivý pohlavní styk), dysurie (obtížné močení), chronická pánevní bolest, neplodnost, chronická únava, nauzea, zvracení. Neplodnost u endometriózy je zejména zapříčiněna devastací ovariální tkáně nebo funkce vejcovodů endometriálními lézemi. Faktorů a mechanismů ale je pravděpodobně více. Etiologie endometriózy není zatím zcela objasněna, a proto neexistuje kauzální léčba (Kovacs, 2006).

K dalším příčinám neplodnosti u žen se řadí poruchy dělohy a pochvy (například pacientky se syndromem Rokitanski – Küstner – Hauser), nutriční poruchy či imunologické faktory (Řezáčová *et al.*, 2018).

### **3.2. Poruchy plodnosti u mužů**

Muži se podílejí na poruchách plodnosti přibližně stejnou mírou jako ženy. Jejich léčba však ani v dnešní moderní době není ekvivalentní s léčbou žen. Preventivní andrologie na rozdíl od gynekologie u nás není zavedena. Muži se obvykle o problému se svou plodností dozví, až se

s partnerkou neúspěšně pokoušejí o početí dítěte. Po neúspěšné snaze přesahující obvykle šest měsíců a déle následuje první doporučení k vyšetření spermiogramu (SPG) (na doporučení gynekologa partnerky). Pokud je výsledek vyšetření opakovaně patologický, následuje zařazení ženy do programu asistované reprodukce pro mužský faktor sterility. Přitom lékař specialista (androlog) by měl kromě základního urologického vyšetření vyšetřit i SPG a v případě abnormálního nálezu by doporučil další postup léčby (Kubíček, 2015).

V současnost se pomalu rozvíjejí projekty některých organizací (např. Merck), které chtějí pro muže zpřístupnit možnost vyšetření SPG a získat tím širší povědomí o problému mužské neplodnosti. Nejznámějším počinem je v současnosti projekt s názvem je „Muži činu“ ([www.muzicinu.cz](http://www.muzicinu.cz)).

Mezi nejčastější příčiny mužské neplodnosti je řazena varikokéla, což je rozšířená žilní pleteň v oblasti šourku. Dochází tak k městnání krve v cévách zásobujících varle a tím dochází k zvýšení teploty v šourku, což není ideální pro proces spermiogeneze (Bozhedomov *et al.*, 2014). Včasná diagnostika a léčba varikokély může zabránit atrofizaci semenotvorných kanálků a tím pádem zachovat spermiogenezi i do budoucna. Mimo jiné může být varikokéla pro muže značně bolestivá. Varikokéla je standardně řešena operačně, kdy jsou varixy v oblasti šourku redukovány podvazem nebo embolizací. V současnosti nejlepších výsledků s minimálními komplikacemi a malým počtem recidiv dosahují subingvinální mikroskopické operační techniky s důsledným šetřením testikulární arterie a lymfatických cév (Pathak *et al.*, 2016; Řezáčová *et al.*, 2018).

Dalším důvodem mužské neplodnosti může být kryptorchismus, který je definován jedním (jednostranný kryptorchismus) nebo oběma nesestoupými varlaty do šourku. Varlata vznikají v prenatálním vývoji v břišní dutině a koncem 7. měsíce intrauterinního vývoje začínají sestupovat ingvinálním kanálem do šourku. Sestup varlat je regulován hormonálně. Výskyt kryptorchismu se zjišťuje u donošených novorozenců ve 2-9 %. Pokud varle spontánně nesestoupí do 1 roku života je doporučena konzervativní a následně chirurgická léčba, ideálně do 2. roku života dítěte. Jinak hrozí nevratné změny Leydigových buněk, které produkují mužské pohlavní hormony, zejména testosteron. Navíc je kryptorchismus i rizikovým faktorem vzniku karcinomu varlete (Skakkebaek *et al.*, 2016).

Pokud je u muže diagnostikován patologický spermiogram, narůstá pravděpodobnost výskytu nějaké chromozomální aberace. Při azoospermii se u pacientů chromozomální aberace zjistí až u 15 % případů. Nejčastější chromozomální poruchy u mužů jsou Klinefelterův syndrom, mikrolece chromozomu Y a cystická fibróza. U klasického Klinefelterova syndromu je v dospělém věku narušen vývoj sekundárních pohlavních orgánů, pacienti mají menší penis, je snížen vývoj ochlupení a růst vousů, varlata jsou hypoblastická a ve varlatech se netvoří spermie. Při výskytu Klinefelterova syndromu v mozaice mohou být muži bez příznaků, včetně zachované plodnosti. U chlapců s Klinefelterovým syndromem je až do puberty normální koncentrace testosteronu, FSH, LH, anti-Mülleriánského hormonu (AMH), inhibinu B, inzulinu podobného proteinu 3 (INSL3). Až během puberty začíná testikulární regrese a zastavuje se spermiogeneze vlivem snižování koncentrace androgenů a zvyšování koncentrace FSH a LH. 75 % mužů o své nemoci neví, dokud se nezačnou snažit o početí potomka. Pokud by se takto postižení muži léčili (hormonální substituce pod dohledem endokrinologa), ideálně od svých 11–12 let, mohli by v dospělosti žít jako naprosto zdraví jedinci (Asero *et al.*, 2010; Hawksworth *et al.*, 2018).

Mikrolece chromozomu Y se vyskytují v oblasti AZF (azoospermia faktor) na dlouhých raménkách Yq11, který obsahuje geny zodpovědné za spermiogenezi. Tato oblast byla rozdělena na suboblasti AZFa, AZFb, AZFc, přičemž až 80 % takto postižených mužů má delecii v regionu AZFc. Delece v těchto podoblastech způsobují poruchy spermatogeneze u 10 % pacientů s těžkou oligospermií až azoospermií (Rabinowitz *et al.*, 2021). 80 % mikrolecí AZF vzniká *de novo*. Tato genetická porucha je pak přenášena z otce na syny (pokud jsou u otce přítomny spermie) například pomocí léčby IVF a techniky TESE (testikulární extrakce spermií) a získání spermií přímo ze semenotvorných kanálků varlat a oplodnění oocytů metodou ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie) (Asero *et al.*, 2010). Při PGT-A je možné akceptovat volbu embrya ženského pohlaví a zamezit tak přenosu poruchy na mužského potomka (Cariati *et al.*, 2019).

Cystická fibróza a kongenitální oboustranná absence chámovodu (CBAVD) je jedno z nejčastějších genetických onemocnění u bělochů (Castellani *et al.*, 2009). Vzniká kvůli mutacím v genu CFTR (regulátor transmembránového vedení cystické fibrózy, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který kóduje chloridový přenos na buněčných membránách. Infertilita u mužů s tímto onemocněním je spojena s obstrukční azoospermií.



Gen CFTR kóduje membránový protein působící jako iontový kanál a reguluje také tvorbu ejakulačního vývodu, semenného váčku, chámovodu a distálních dvou třetin nadvarlete. Gen CFTR je postnatálně exprimován v nadvarleti. Nachází se v proteinu, který lemuje koncový epitel nadvarlete. Působí při transportu elektrolytů v epitelu nadvarlete a pomáhá tak udržet optimální prostředí pro tvorbu spermií a jejich transport. Gen CFTR odpovídá také za transport iontů  $\text{HCO}_3^-$ , které se podílejí na kapacitaci spermií. Z těchto důvodů v mutace v genu CFTR vedou u mužů k redukci fertilizační schopnosti spermií, poruše jejich zrání a tedy infertilitě, které nemusí být způsobenou pouze obstrukcí chámovodů. U pacientů s CBAVD mělo téměř 80 % mužů zjištěnu nejméně jednu mutaci v genu CFTR a téměř 50 % mělo prokázané 2 mutace. CBAVD je onemocnění příbuzné cystické fibróze a tvoří samostatnou klinickou jednotku. U těchto mužů probíhá spermatogeneze normálně, a tak jsou vhodní kandidáti pro zákrok TESE nebo pro mikrochirurgické odsátí spermií z nadvarlete (MESA) (Yu *et al.*, 2012).

Až 80 % dětí s cystickou fibrózou se rodí v rodinách bez výskytu tohoto onemocnění (rodiči jsou bezpříznakoví heterozygoti pro některou z mutací CFTR). Proto jsou v současnosti snahy provádět screeningová vyšetření mutací tohoto genu alespoň u párů, které plánují podstoupit IVF léčbu nebo u mužů s patologiemi SPG. Přičemž u párů vstupujících do IVF programu se obvykle vyšetřuje první muž, pokud má pozitivní nález na některou z mutací CFTR (v ČR se v současnosti vyšetřuje standardně 35 mutací tohoto genu), tak je následně vyšetřena i partnerka a je stanoveno riziko přenosu onemocnění na potomka. Při zvýšeném riziku přenosu je páru doporučeno podstoupit IVF s preimplantačním genetickým testováním monogenních onemocnění (PGT-M) (Brennan *et al.*, 2016).

Syndrom androgenní insenzitivity je geneticky podmíněné onemocnění s X-vázanou recesivní dědičností spojené s poruchou genu pro androgenní receptor lokalizovaný na Xq11-12. Postižení jedinci mohou mít různý fenotyp související se sníženou citlivostí k androgenům (plné fenotypové vyjádření ženským směrem, intersexuální utváření genitálu, azoospermie, kryptorchismus, hypospadiie, gynekomastie, projevy snížené virilizace). Většina mužů má zvýšenou hladinu LH (Hughes *et al.*, 2012).

Syndrom fragilního X (FRAXA) je příčinou je nejčastější příčinou mentální retardace u mužů. Jedná se o přítomnost expanze trinukleotidového opakování CGG v exonu 1 v genu FMR1, který je lokalizován na Xq27.3. V obecné populaci je zjišťováno méně než 50 opakování. 200 a více opakování je považováno za plnou mutaci, která způsobuje mentální retardaci. Premutace

je popsána jako 50-200 opakování u žen, kde může být asociována s předčasným ovariálním selháním. Přenašečkám lze v současnosti nabídnout provedení preimplantačního genetického testování v cyklu IVF léčby (Wittenberger *et al.*, 2007).

Záněty mužských pohlavních orgánů mohou být příčinou až infertility, mohou být akutní i chronické, s nejrůznější etiologií. Mezi výše zmíněné záněty je řazen *orchitis* (zánět varlat), *epididymitis* (zánět nadvarlat), *prostatitis* (zánět prostaty), *prostatovesiculitis* (zánět prostaty a močového měchýře). Bez včasné léčby může být nevratně poškozena spermiogeneze, po neléčeném zánětu může vzniknout až obstrukční azoospermie. Nejčastěji bývá infekce vyvolaná bakterií *Chlamydia trachomatis*, což je patogen vyskytující nejčastěji v pohlavních orgánech mladých lidí, kteří často střídají sexuální partnery (Azenabor *et al.*, 2015).

Endokrinní příčiny a imunologické příčiny mužské neplodnosti dost často spolu souvisejí a navzájem se podmiňují. Muži s diabetem mají časté záněty genitálií a kvasinkové záněty močové trubice (Nitzan *et al.*, 2015). Porucha plodnosti je způsobena také vyšší fragmentací DNA spermií (Agarwal *et al.*, 2017). Tyreopatie negativně ovlivňují funkci gonád u obou pohlaví, přičemž nejčastěji se jedná o tyreopatie autoimunitní (Poppe *et al.*, 2002; Krajewska & Sengupta, 2013).

K dalším příčinám neplodnosti u mužů patří obezita (Leisegang *et al.*, 2020), kouření, nadměrné požívání alkoholu nebo drog (Sansone *et al.*, 2018) stres a nezdravý životní styl (Ilacqua *et al.*, 2018), užívání anabolik (El Osta *et al.*, 2016). Negativní vliv na spermiogenezi má znečištěné životní prostředí: vystavení se určitým chemikáliím (např. polycyklickým aromatickým uhlovodíkům), těžkým kovům, pesticidům, elektromagnetickému záření. Škodlivý je také dlouhodobý pobyt v horkém prostředí, sedavé zaměstnání a obecně nedostatek pohybu (Walczak-Jedzejowska *et al.*, 2013).

### **3.3 Metody asistované reprodukce**

Asistovaná reprodukce je medicínský obor, který poskytuje širokou mezioborovou spolupráci například s onkologií, imunologií, urologií, hematologií nebo endokrinologií. Mezi metody asistované reprodukce jsou řazeny všechny léčebné techniky, které manipulují se zárodečnými buňkami (oocyty, spermii). Cílem specialistů v oboru je snaha pomoci co největšímu počtu neplodných párů mít geneticky vlastní zdravé děti (Řezáčová *et al.*, 2018).

### 3.3.1 Stimulace vaječnicků

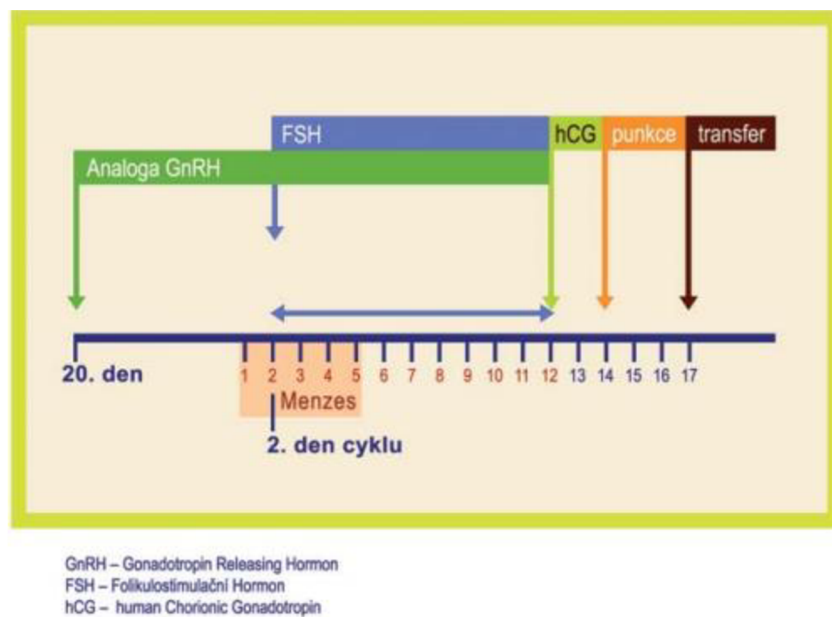
IVF cyklus zahrnuje všechny léčebné procesy, které začínají stimulací ovarií, odběrem oocytů a odběrem spermií, pokračují oplodněním oocytů spermiemi a následnou kultivací embryí (Beckmann *et al.*, 2014).

Vlastní léčba začíná stimulací vaječnicků pacientky. V počátcích asistované reprodukce v 80. letech 20. století byl ke stimulaci ovarií nejvíce používán klomifencitrát (CC), což je antiestrogenní preparát, který selektivně blokuje zpětnovazebné působení estrogenů na hypotalamus, což vede rychlému vzestupu gonadoliberinů, posléze i gonadotropinů (FSH, LH) a estrogenů. Nevýhodou jeho použití bývala potřeba kontrolovat endogenní sekreci LH, protože uvolnění i nevelkého množství LH, které sice nevedlo k indukci ovulace, vedlo k zisku přezrálých oocytů a následně nekvalitních embryí. Nicméně k jeho používání se dnes vracíme zejména po zavedení používání antagonistů GnRH k stimulaci ovarií (Homburg, 2005).

Exogenní použití gonadotropinů vede k záchraně kodominantních folikulů aktuální rostoucí folikulární kohorty, které tím pádem nepodléhají atrézii a pokračují dál v růstu a ve vývoji. Zároveň se s vývojem biotechnologií zvýšila čistota gonadotropinů, efektivita jejich použití a také bezpečnost pro pacientku. V dnešní době jsou nejčastěji používány rekombinantní gonadotropiny, např. corifollitropin alfa, který má navíc prodlouženou dobu účinku a zajistí stimulaci gonadotropin-senzitivních folikulů po dobu až 7 dní. Moderní stimulační léky se dnes aplikují subkutánně, běžně s použitím tzv. aplikačního pera, u kterého je výhodou velmi jednoduché použití pro pacientku (Fauser *et al.*, 2009).

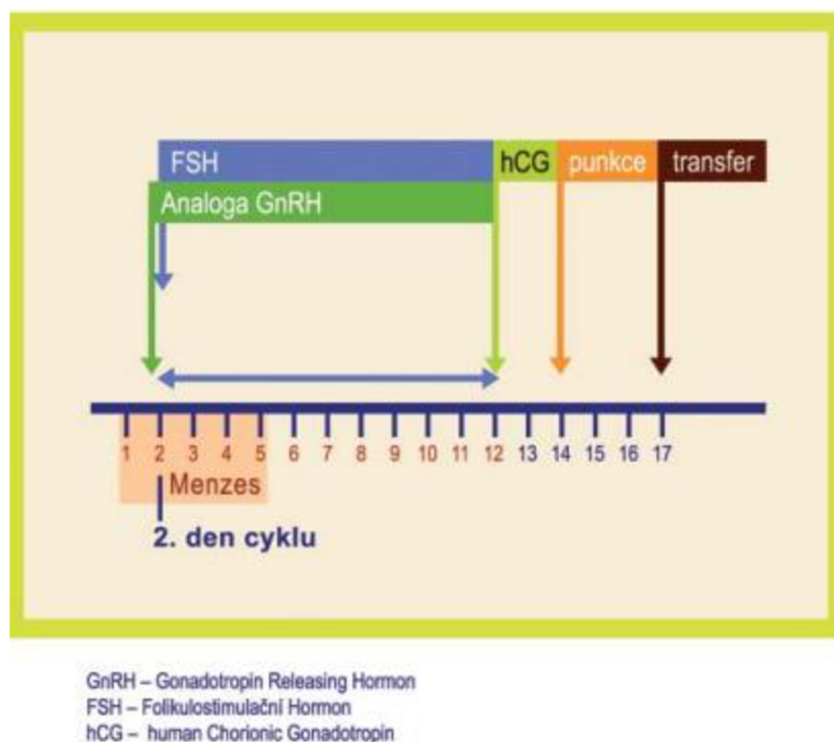
Vývojem analogů GnRH, konkrétně agonistů GnRH, se 100–200 x zvýšila vazebná afinita k receptorům buněk uvolňujících gonadotropiny v adenohipofýze a současně se prodloužil poločas rozpadu na několik hodin, ve srovnání s biologickým poločasem rozpadu několika minut u nativních GnRH. Okamžitá reakce na podání agonisty GnRH je podobná účinku nativního GnRH: bezprostřední syntéza a sekrece FSH a LH a zvýšení počtu receptorů, tzv. flare-up efekt. Vzhledem k dlouhodobému obsazení receptorů ale dojde následně k internalizaci receptorů do buňky, která pak přestane reagovat na GnRH, a tím klesá koncentrace FSH, LH a estradiolu. Této „down regulace“ je dosaženo za 14–21 dní od počátku aplikace agonistů GnRH. Tato blokáda hypofýzy se obnoví přibližně za 6 týdnů od skončení podávání agonistů GnRH. Tohoto principu se využívá v tzv. dlouhém stimulačním protokolu,

kdy aplikace gonadotropinů je zahájena až po prokázané „down regulaci“, což zamezí nežádoucí sekreci LH hypofýzou pacientky (Obr. 1). Nedojde tedy k snížení kvality oocytů díky luteinizaci, ani nehrozí předčasná ovulace. Dlouhý protokol představoval do nástupu antagonistů GnRH standardní postup ovariální stimulace. Jeho nevýhodou je dlouhá doba nástupu „down regulace“, potřeba vyšších dávek gonadotropinů pro adekvátní stimulaci a větší riziko vzniku hyperstimulačního syndromu (OHS) (Humaidan *et al.*, 2010).



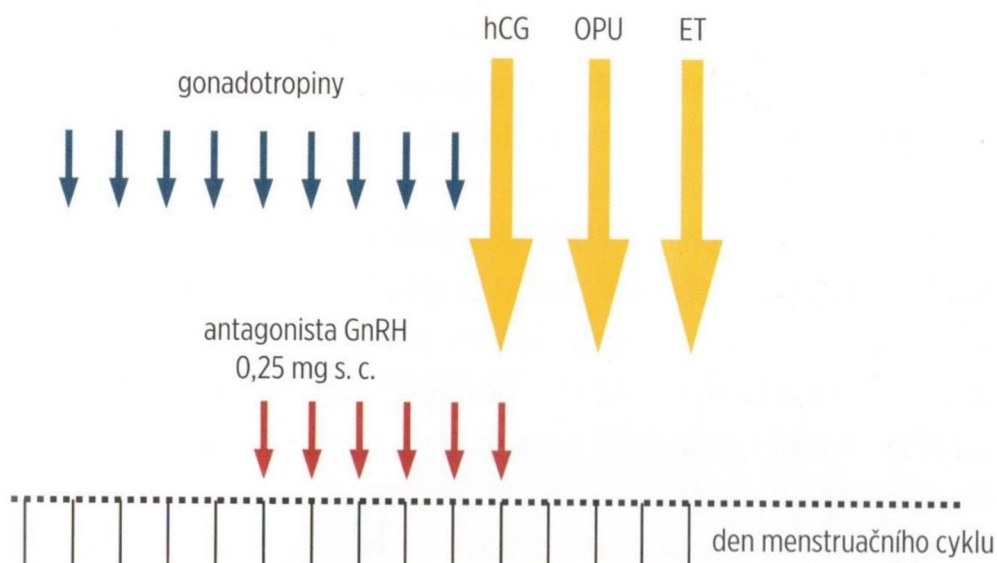
**Obr. 1.** Aplikace léků při dlouhém protokolu stimulace vaječnicků (převzato z Crha, I., Farmakoterapie v reprodukční medicíně, 2010)

Aplikace agonistů GnRH může být zahájena také současně se zahájením aplikace FSH druhý nebo třetí den menstruačního cyklu ženy, v tomto případě se hovoří o tzv. krátkém protokolu (Crha, 2010) (Obr. 2).



**Obr. 2.** Aplikace léků při krátkém protokolu stimulace vaječnicků (převzato z Crha, I., Farmakoterapie v reprodukční medicíně, 2010)

Třetí generací preparátů k ovariální stimulaci jsou tzv. antagonisté GnRH. Mechanismem účinku antagonistů GnRH je kompetiční blokáda GnRH receptorů v buňkách adenohipofýzy. Když je aplikována stimulační dávka ve správné koncentraci, tak okamžitě zablokuje syntézu FSH a LH. Stimulace je standardně zahájena na začátku cyklu přímo gonadotropiny a v okamžiku, kdy teoreticky začíná hrozit nežádoucí sekrece LH, je hypofýza pacientky zablokována antagonistou. Obvykle je podání antagonisty nastaveno fixně 6. den menstruačního cyklu pacientky, nebo flexibilně jakmile dominantní folikul dosáhne 14 mm. Výhodou stimulačních protokolů s antagonistou GnRH je jejich jednoduchost, kratší doba trvání stimulace, nižší spotřeba gonadotropinů, nižší riziko OHS (Greisinger *et al.*, 2006) (Obr. 3).



**Obr. 3.** Stimulační protokol s antagonistou GnRH (převzato z Řezáčová *et al.*, Reprodukční medicína, 2018)

### 3.3.2 Intrauterinní inseminace

Nejjednodušší metodou asistované reprodukce, co se týče provedení, je intrauterinní inseminace (IUI). V současnosti se řadí do první linie léčby neplodných párů zejména s mužským faktorem neplodnosti, ovulační dysfunkcí a cervikálním faktorem u ženy (Miller *et al.*, 2002). Je to jednoduchá, levná, neinvazivní a pro pacientku bezpečná technika. Lékař při ní pomocí inseminačního katetru zavede upravené a vyselektované spermie v kultivačním roztoku přes hrdlo děložní do děložní dutiny ženy v době ovulace. Před IUI jsou spermie upraveny a vyselektovány a zbaveny seminální plazmy gradientovou centrifugací nebo metodou swim-up (Marín-Briggiler *et al.*, 2002), při které je ve zkumavce standardně 1 ml ejakulátu převrstven 1 ml média pro spermie (s HEPES pufrem) a zkumavka je umístěna v inkubátoru (37 °C) na 30 minut. Po této době je pipetou stažena opatrně vrchní vrstva média s pohyblivými spermii do čisté zkumavky. Tuto suspenzi je možné následně centrifugovat při nízkých otáčkách, aby bylo dosaženo požadované koncentrace spermií v médiu. Do dělohy bývá pacientce zavedeno obvykle 0,5 - 2,0 ml této suspenze (Nuojua-Huttunen *et al.*, 1999).

Šance na otěhotnění po provedení IUI se pohybuje na Klinice reprodukční medicíny a gynekologie ve Zlíně kolem 13 %, podle typu hormonální stimulace pacientky, což odpovídá celosvětově uváděným datům. IUI se může provést v přirozeném cyklu (bez hormonální

podpory), po stimulaci růstu folikulů v ovariu pomocí CC nebo po stimulaci pomocí FSH. K indukci ovulace se obvykle používá lidský choriový gonadotropin (hCG). Zvýšené dávky hormonální stimulace sice slibují vyšší počet těhotenství na počet provedených IUI, ale zároveň zvyšují riziko OHS a vícečetného těhotenství. Indikací k IUI jsou lehce snížené hodnoty SPG, kdy se laboratorním zpracováním zvyšuje koncentrace pohyblivých spermií v médiu k zavedení do dělohy partnerky; imunologické příčiny bránící spermiím proniknout přes hrdlo děložní; anovulační cykly u ženy, kdy se pomocí CC nebo FSH navodí růst folikulů a pomocí hCG se načasuje ovulace. Azoospermie nebo geneticky přenosné onemocnění muže je indikací k použití spermií dárce, které je možné použít i pomocí IUI (Kovacs, 2011). Kontraindikací je pak oboustranná neprůchodnost vejcovodů pacientky (Řezáčová *et al.*, 2018).

### 3.3.3 *In vitro* fertilizace a embryotransfer

*In vitro* fertilizace (IVF) a embryotransfer (ET) jsou další metody, které jsou v dnešní době považovány za relativně jednoduché. Narození Louisy Brownové, prvního dítěte narozeného po použití IVF a ET v roce 1978, je spojováno s počátky IVF (Steptoe & Edwards, 1978). Tomuto úspěchu předcházelo více než 20 let práce zejména v oblasti stimulace vaječnicků a superovulace myších samic (Fowler & Edwards, 1957), zrání (Edwards, 1965) a fertilizace lidských vajíček (Edwards *et al.*, 1969). V Československu a také v zemích tehdejší východní Evropy se první dítě „ze zkumavky“ narodilo v roce 1982 po léčbě neplodnosti u pacientky na I. Gynekologicko – porodnické klinice fakultní nemocnice Brno po metodě GIFT (intrafalopický přenos gamet, gamete intrafallopian transfer), původně popsán jako OIVI-TT (inseminace oocytů *in-vitro* a transfer do vejcovodu, oocyte *in vitro* insemination and tubal transfer) (Tesařík *et al.*, 1983). Vedoucím lékařem tohoto týmu byl prof. MUDr. Ladislav Pilka, DrSc., který řadu let působil jako vedoucí lékař na Klinice reprodukční medicíny a gynekologie ve Zlíně.

#### **Konvenční IVF**

Vlastní metoda IVF (konvenční IVF) spočívá v přidání pročištěných a zkoncentrovaných pohyblivých spermií partnera do speciální kultivační misky přímo k oocytům (kumulo-oocytárním komplexům) partnerky. SPG partnera by měl splňovat určité parametry u hodnot

koncentrace a pohyblivosti, aby měla tato metoda šanci na úspěšné oplození oocytů (Trávník, 2018).

Oocyty bývají odsáty s folikulární tekutinou z folikulů v ovariích, propláchnuty v kultivačním médiu a všechny umístěny do kultivační misky s kultivačním (fertilizačním) médiem. Odběr folikulární tekutiny je proveden pomocí duté dlouhé punkční jehly pod UZ kontrolou (vaginální UZ sonda) po jejich řízené hyperstimulaci obvykle 12. až 15. den menstruačního cyklu standardně 36 hodin po aplikaci triggeru hCG (Pregnyl, Ovitrelle) (Weiss *et al.*, 2014).

Odebrané oocyty jsou po odběru tvořeny jak vlastním vajíčkem, tak množstvím buněk, které vajíčko obklopují a chrání, tzv. kumulo-oocytárním komplexem (COC). Tyto odebrané COC jsou v laboratoři důkladně promyty v kultivačních médiích a uloženy do kultivačního boxu, kde jsou uloženy do doby oplození spermii partnera. Spermie, ideálně v koncentraci 50 000 spermií na mililitr, se k COC přidávají obvykle po 4 hodinách po odběru a promytí oocytů. Dohromady se nechávají kultivovat oba typy gamet obvykle 1 až 2 hodiny. Poté se oocyty (částečně již bez kumulárních buněk) přenesou do čistého kultivačního média. Zda došlo ke správné fertilizaci oocytů lze zjistit sledováním přítomnosti prvojadry po 16 až 18 hodinách po předchozím očištění oocytů od zbytků kumulárních buněk a spermií (Trávník, 2018).

Správně oplozené oocyty (se dvěma prvojádry, 2PN) se nechají kultivovat 2 až 6 dní. Embryotransfer (zavedení embrya do dělohy) se provádí 48 až 140 hodin od fertilizace oocytů pomocí speciálního transferového katétru obvykle pod ultrazvukovou kontrolou (břišní UZ sonda). Úspěšnost léčby po IVF – ET se pohybuje mezi 30 % až 40 % klinických těhotenství na embryotransfer (Řezáčová *et al.*, 2018).

Konvenční metoda IVF je v současnosti stále méně používána, zejména proto, že výsledky SPG u mužů se dlouhodobě zhoršují a také proto, že poměr oplozených oocytů z celkového počtu oocytů (fertility rate) je pouze kolem 60 % ve srovnání s fertility rate po provedení oplození pomocí metody ICSI – intracytoplazmatické injekce spermie, kde dosahuje více než 80 % (Trávník, 2018).



## ICSI – intracytoplazmatická injekce spermie

Průlomovou metodou v léčbě neplodnosti je metoda ICSI (Palermo *et al.*, 1992) používaná od devadesátých let 20. století (Obr. 4).

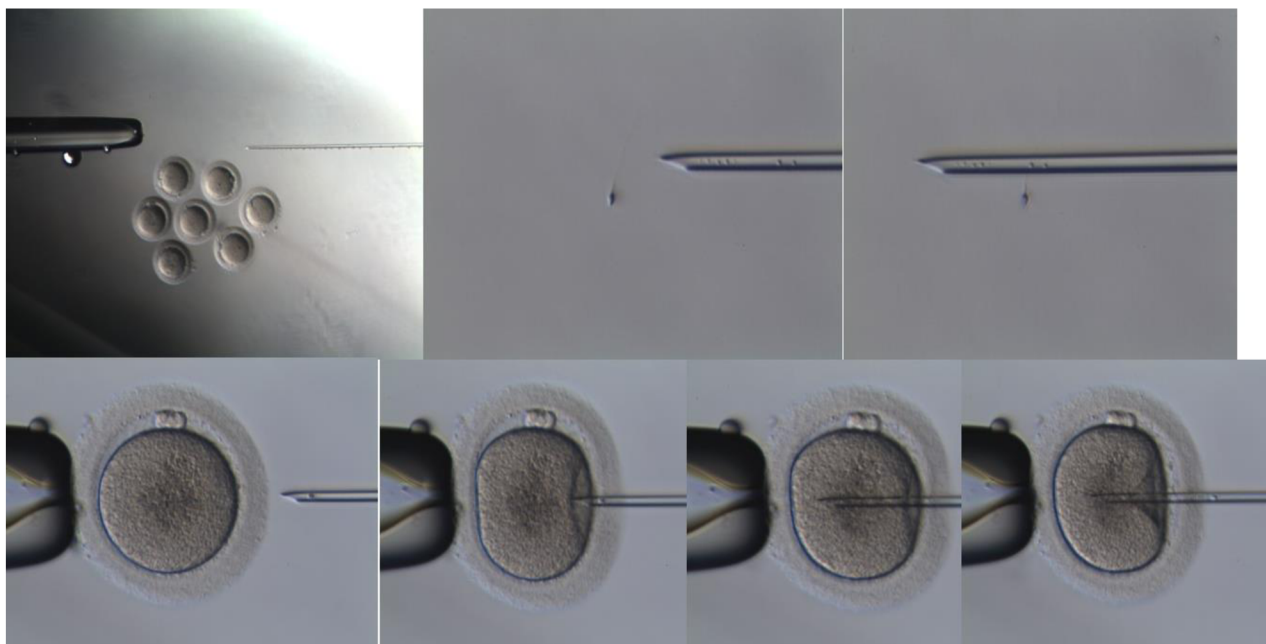
Tato, v dnešní době osvědčená a celosvětově dobře zavedená metoda, spočívá v zavedení jedné vybrané spermie do cytoplazmy zralého a očištěného (denudovaného) oocytu. ICSI se provádí pomocí jednorázových skleněných mikromanipulačních nástrojů – holding pipety, která se používá k uchycení a manipulaci s oocytem, a ICSI pipety, která je velmi tenká a slouží k znehybnění, nasátí a injikování spermie do oocytu po provedení ruptury membrány oocytu (oolemy) (Vanderzwalmen *et al.*, 1996).

Obě pipety jsou uchyceny v ramenech mikromanipulátoru, které díky převodním systémům mohou vykonávat pohyb ve třech rovinách. Mikromanipulátor je schopen převést hrubý pohyb lidských rukou na velmi jemný pohyb, který je ideální pro manipulaci s lidskými gametami (Coward & Wells, 2013).

Druhou funkcí mikromanipulátoru je možnost nasávat a vypouštět skrz holding a ICSI mikromanipulační pipetu tekutinu (kultivační médium) a tím přichytit k pipetě oocyt a nasát spermii do pipety a injikovat ji do vajíčka. Tento systém nasávání je obvykle řešen přes posun sloupce oleje nebo vzduchu, kultivační médium je nasáto v malém objemu až na konci manipulační pipety. Mikromanipulátor je obvykle připojen k inverznímu mikroskopu s Hoffmannovým kontrastem, kde se pracuje se zvětšením 200x až 400x (Trávník, 2018).

Metoda ICSI se stala se východiskem pro páry s patologickými hodnotami spermioqramu (nízká koncentrace a pohyblivost spermií). V současnosti je velmi hojně používána zejména pro svou vyšší spolehlivost ve srovnání s konvenční IVF metodou. Úspěšnost léčby po IVF/ICSI – ET se pohybuje mezi 40-45 % klinických těhotenství na provedený ET (Řezáčová *et al.*, 2018).

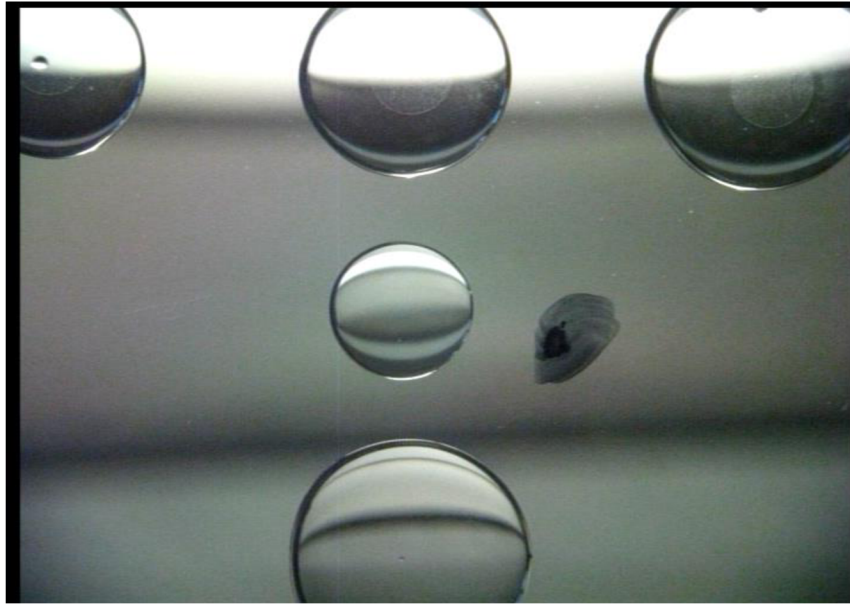
V současnosti je dle aktuálních informací z výboru Sekce asistované reprodukce ČGPS metoda ICSI používána ve více než 85 % cyklů asistované reprodukce.



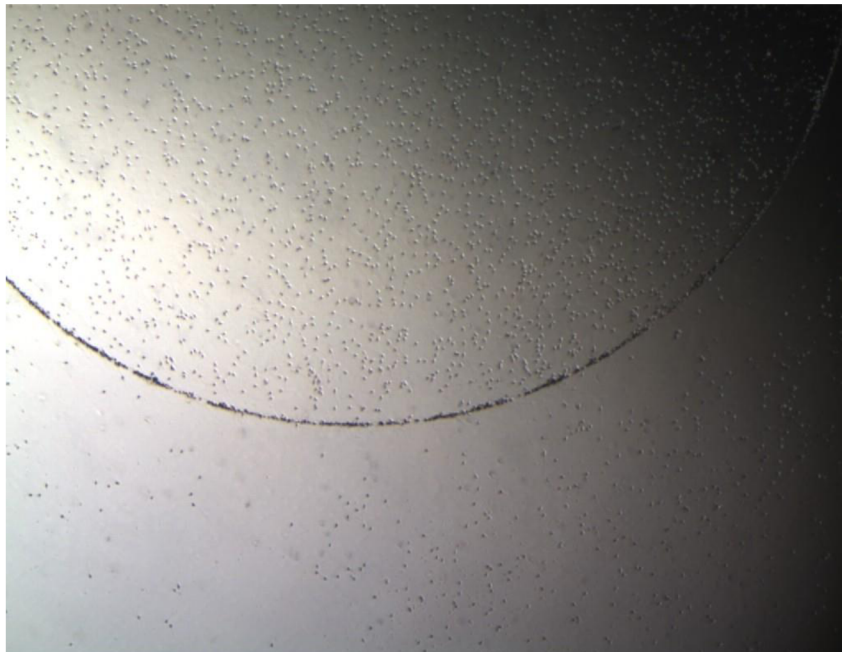
**Obr. 4.** ICSI: Oocyty (MII) připravené k fertilizaci, znehybnění vyselektované spermie, injekce spermie do oocyty s aspirací ooplazmy na závěr ICSI techniky (zvětšeno 100x, 200x, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín)

#### **PICSI – intracytoplazmatická injekce předem vybrané spermie**

V současnosti jsou k dispozici i metody k preselekcii spermií před vlastním provedením techniky ICSI. Jednou z těchto metod je PICSI (Obr. 5). Vlastní selekce spermie probíhá na základě vazby zralé spermie na hyaluronan, který je umístěn na dně 50 mm Petriho misky, ve které se poté provádí ICSI. Tyto kapičky hyaluronanu se převrství nahřátým manipulačním médiem, nechají 20 minut ekvilibrovat v kultivačním boxu bez CO<sub>2</sub> a pak se mohou přidat spermie pročištěné obvykle metodou swim-up. Vazba spermie na hyaluronan na dně misky (Obr. 6) imituje přirozenou vazbu zralé spermie na buňky kumulo-oocytárního komplexu, který hyaluronan také obsahuje, před vlastním oplozením oocyty (Trávník, 2018). Zralé spermie vázající se na hyaluronan mají statisticky nižší zastoupení aneuploidních a diploidních spermií a jsou tedy nejvhodnější pro oplození oocytů (ESHRE, 2015).



**Obr. 5.** PICSI – nahoře tři kapky manipulačního média překrývají fixovaný hyaluronan (mléčně světlé kruhy) s přidanými spermii, uprostřed kapka PVP pro zpomalení spermií, dole kapka manipulačního média pro práci s oocyty (zvětšeno 10x, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín)



**Obr. 6.** PICSI: na oblast s hyaluronanem (kruhová výseč na obr.) se vážou zralé spermie (zvětšeno 100x, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín)

## **IMSI - intracytoplazmatická injekce morfologicky vybrané spermie**

Pomocí metody IMSI jsou vybírány spermie pro ICSI na základě jejich podrobné morfologie, kdy jsou spermie zvětšeny více než 6000x. Embryologem jsou vybrány spermie bez defektů, zejména je pozornost směřována na morfologii hlavičky, kdy jsou preferovány spermie bez vakuol a s normálně tvarovaným jádrem. Pro selekci spermií je používán inverzní mikroskop s imerzním objektivem, kamerou a speciálním softwarem k vyhodnocení. Metoda je časově poměrně náročná, protože je vybírána velmi podrobně každá spermie zvlášť (Bartoov *et al.*, 2003).

## **Mikrofluidní čipy**

Použitím mikrofluidních čipů je možné spermie selektovat na základě jejich pohybu čistě mechanicky bez použití dalších přídavných látek. Metoda je velice elegantní. Spermie z nativního ejakulátu, který se přidá do vstupního otvoru v čipu, musí projít úzkými kanálky skleněného čipu (Zymot ICSI) (Obr. 7) nebo velmi jemným sítkem dvoukomorového skleněného čipu (Zymot Multi), který je doporučen pro selekci spermií z ejakulátu s nižší pohyblivostí a koncentrací spermií. Čipy jsou těsně před použitím a přidáním spermií vyplněny ekvilibrovaným manipulačním médiem pro spermie. Kanálky v čipu imitují průchod spermií hrdlem děložním, dělohou a vejcovody při cestě k ovulovanému vajíčku. Do sběrné jamky na konci kanálků čipu nebo po překonání sítko se dostanou jen spermie s přímočarým a progresivním pohybem, u kterých je vysoká pravděpodobnost normální genetické výbavy (Raheel *et al.*, 2018).



**Obr. 7.** Mikrofluidní čip (Zymo ICSI) k separaci progresivně pohyblivých spermií (Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín)

### **MACS - magneticky aktivované třídění buněk**

MACS je metoda selekce spermií založená na magnetické aktivaci apoptotických spermií (Dirican *et al.*, 2008) (Obr. 8). MACS využívá principu magnetického označení defektních spermií, které se vychytají pomocí magnetického pole a jsou následně odstraněny ze vzorku. Na první pohled totiž nelze rozlišit, zda mají spermie kvalitní DNA, což je velmi významný aspekt pro následné oplodnění, životaschopnost embrya a udržení těhotenství. Defektní (apoptotické) buňky na povrch vystavují fosfatidylserin a nanomagnetické částice ze systému MACS, konkrétně annexin V navázaný na feromagnetické částice, se na fosfatidylserin naváží. Spermie s navázanými magnetickými částicemi po průchodu kolonou v magnetickém poli zůstávají uvnitř kolony. MACS je novou generací selekce spermií nejvyšší kvality, které se zachytí a do sběrné zkumavky se dostanou jen spermie v neapoptotické fázi buněčného cyklu. Tyto vyselektované spermie se umístí do zkumavky a do doby ICSI jsou udržovány při 37 °C v kultivačním boxu bez CO<sub>2</sub> (Esbert *et al.*, 2017).

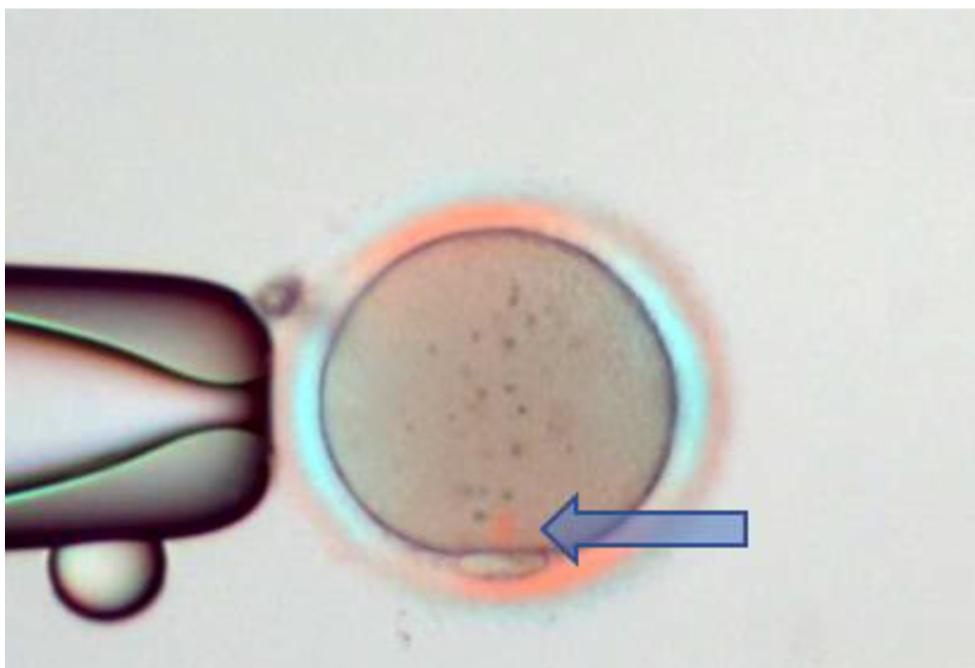


**Obr. 8.** MACS: kolona se spermii v magnetickém poli, pod kolonou je umístěna sběrná zkumavka pro neapoptické spemie, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín

### **Polarizační mikroskopie**

Polarizovaného světla lze v současnosti využít k zviditelnění dělicího vřeténka u zralého (MII) oocytu před provedením oplození (ICSI/PICSI) (Obr. 9). Ocyt nemusí být schopný oplození ještě několik hodin po vyloučení prvního polárního tělíška, tedy po dokončení první fáze meiózy, protože nemá zformované dělicí vřeténko. Na základě získaných informací o přítomnosti či nepřítomnosti dělicího vřeténka lze posunout dobu provedení ICSI/PICSI až do doby jeho zformování. U těchto zcela zralých vajíček je pak vyšší pravděpodobnost, že budou zdárně fertilizovány, a také vývojový a implantační potenciál embryí vzniklých ze zralých vajíček je vyšší. Díky použití speciální Petriho misky se skleněným dnem a dvou speciálních filtrů zakomponovaných do invertovaného mikroskopu lze dělicí vřeténko zviditelnit, přestože v běžném mikroskopu je i při maximálním zvětšení nedetekovatelné. Metoda detekce dělicího vřeténka je řazena mezi neinvazivní metody (Holubcová *et al.*, 2019).





**Obr. 9.** Vizualizované dělicí vřeténko pomocí polarizovaného světla, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín

### **Kultivace embryí**

Dobře zvládnutá metodika kultivace embryí je podmínkou úspěšné léčby pomocí IVF. Cílem kultivace je dosáhnout kvalitního embrya schopného implantace a dalšího vývoje ukončeného porodem zdravého dítěte. Vývoj embrya může být ovlivněn mnoha složkami laboratorního prostředí a systému kultivace embryí. Mezi nejzásadnější parametry je řazeno složení kultivačního média a dostupnost jeho složek, koncentrace CO<sub>2</sub>, koncentrace O<sub>2</sub>, teplota, vlhkost, pH, kontakt s dalšími embryi. Kvalita embrya je samozřejmě silně ovlivněna kvalitou gamet, ze kterých vzniklo (Gardner & Kelly, 2017).

Embrya lze kultivovat buď v konvenčních kultivačních boxech, v tzv. „bench-top“ inkubátorech nebo v kultivačních boxech vybavených systémem time-lapse. Kultivační podmínky se ve všech typech kultivačních boxů dají nastavit podobné, tzn. 37 °C, 6-7 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, vlhkost vzduchu může být 100 % nebo může být využívána tzv. suchá kultivace bez zvlhčení vhaněných plyných směsí (Trávník, 2018).

Lidská embrya je možné kultivovat 2 až 6 dní. Pokud se embrya kultivují kratší dobu, tzn. 2 nebo 3 dny, je výhodou kratší expozice kultivačnímu médiu. Druhý nebo třetí den kultivace je ale zase mnohem obtížnější vybrat to nejlepší embryo k ET a ke kryokonzervaci, protože

obvykle velká skupina embryí se do cca 3. dne (stadium 8 buněk) vyvíjí podobně. Scott *et al.* (2007) prokázali, že první den kultivace je důležitým parametrem morfologie prvojadra, druhý den kultivace počet, symetrie a nukleace blastomer a dále schopnost dělení od druhého do třetího dne. Kritickým momentem je čtvrtý den vývoje tzv. kompaktace embrya, která je známkou aktivace embryonálního genomu. Kompaktovaná embrya na čtvrtý den vývoje mají vyšší implantační potenciál (Ebner *et al.*, 2009).

Zdá se, že nejlepším výběrovým kritériem je dosažení stádia blastocysty na pátý den kultivace. Stádia blastocysty dosáhne maximálně 50 % lidských embryí. U blastocysty se hodnotí kvalita trofektodermu a vnitřní masy buněk (ICM). Obě části jsou důležité pro úspěšnou implantaci, zdravé těhotenství a porod dítěte (Ebner *et al.*, 2016).

Kultivační média jsou velmi důležitým faktorem celé IVF léčby, protože tvoří přímé prostředí vyvíjejícího se preimplantačního embrya. Je zřejmé, že kultivační média ovlivňují vývoj embrya i výsledek těhotenství (Mantikou *et al.*, 2013).

Kultivační média jsou v současnosti dodávána komerčními výrobci, kteří složení svých produktů velmi pečlivě testují. Konečný produkt má vyvážené složení a respektuje fyziologii embrya. Moderní kultivační média korespondují svým složením se složením tubárního a endometriálního sekretu, jsou vodným roztokem mnoha organických a anorganických látek, které mají svou specifickou metabolickou funkci a také zajišťují ideální osmolaritu, pH, redukčně – oxidační vlastnosti či iontové parametry. Nejběžnější součástí jsou sodíkové, draslíkové, vápenaté a hořčíkové ionty, které zajišťují membránový potenciál, podílejí se na transportních funkcích a osmotické rovnováze. Vápenaté ionty mají nezastupitelnou úlohu při aktivaci oocyty při oplození. Z aniontů jsou přítomny sulfát, fosfát a bikarbonát. Hlavními zdroji energie pro embrya jsou pyruvát a laktát, které se uplatňují zejména v první fázi preimplantačního vývoje (do kompaktace embrya třetí až čtvrtý den vývoje, D0-D4). Glukóza se stává zdrojem energie od kompaktace embrya (D4-D6). Aminokyseliny, které jsou taktéž v kultivačních médiích přítomny, hrají důležitou úlohu jako osmolyty, pufrý, antioxidanty, regulátory energetického metabolismu, zdroje energie a biosyntetické prekurzory. V kultivačních médiích jsou obsaženy také makromolekulární látky, což jsou nejčastěji rekombinantní lidský albumin a hyaluronan. Obě tyto látky jsou fyziologickou součástí tubárního sekretu. Hlavní úlohou makromolekulárních látek obsažených v kultivačních médiích je ochrana buněčných membrán embryí a snížení jejich přilnavosti k pipetám a



kultivačním miskám. V kultivačních médiích bývají obsaženy i chelátory, nejčastěji se jedná o kyselinu etylendiamintetraoctovou (EDTA). V některých médiích bývají obsaženy růstové faktory, jako inzulínu podobný růstový faktor (IGF) nebo faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF). Často výrobci do kultivačních médií přidávají i vitamíny jako thiamin, biotin, riboflavin, pyridoxin, niacinamid nebo pantotenát. V neposlední řadě se do kultivačních médií přidávají i antibiotika, nejčastěji gentamycin, což je širokospektrální antibiotikum blokující bakteriální proteosyntézu (Gardner *et al.*, 2012).

Kultivační média jsou sestavena tak, aby udržela pH ve fyziologických mezích, zejména pomocí systému oxid uhličitý a bikarbonát. Každé kultivační médium je nutné před použitím ke kultivaci embryí řádně ekvilibrovat, tzn. médium musí dosáhnout požadované teploty a nasycení plyny. Tento proces trvá řádově hodiny. Kultivační média se rozdělují podle specifického účelu, ke kterému jsou vyrobeny. Fertilizační média je vhodné použít ke konzervativnímu oplození oocytů (jen IVF, bez ICSI/PICSI), protože podporují životaschopnost spermií zvýšeným obsahem glukózy, která je zdrojem energie pro spermie. Sekvenční média (např. cleavage medium, blastocyst medium) mají složení přizpůsobené vývojové fázi embryí, pro kterou jsou určena. Embrya do stadia kompaktace (D3-D4) spotřebovávají hlavně pyruvát a laktát, potřebují také aminokyselinu arginin. Embrya po kompaktaci (D4-D6) jako energetický zdroj využívají glukózu. Jednokroková média mají naopak složení shodné po celou dobu vývoje embrya a jejich výhodou je omezení manipulace s embryi během výměny médií (Řezáčová *et al.*, 2018).

Dalším typem médií jsou tzn. manipulační média s HEPES pufrem, která jsou používána při procesech, kdy je s embryi nebo oocyty či spermii manipulováno v laboratorních podmínkách bez zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>. HEPES pufr je schopný zamezit velkému kolísání pH a udržet ho ve fyziologických mezích. Kolísání pH časným vývojovým fázím embryí velmi škodí, protože samy nejsou schopna pH regulovat. Nicméně pobyt reprodukčních buněk a embryí v manipulačním médiu by měl být co nejkratší (Wale & Gardner, 2016).

Veškerá kultivační a manipulační média jsou vždy převrstvena speciálním minerálním olejem, který zpomaluje odpařování média, zpomaluje difúzi plynů mezi médiem a okolním prostředím. Olej navíc chrání před mikrobiální kontaminací (Wale & Gardner, 2016).

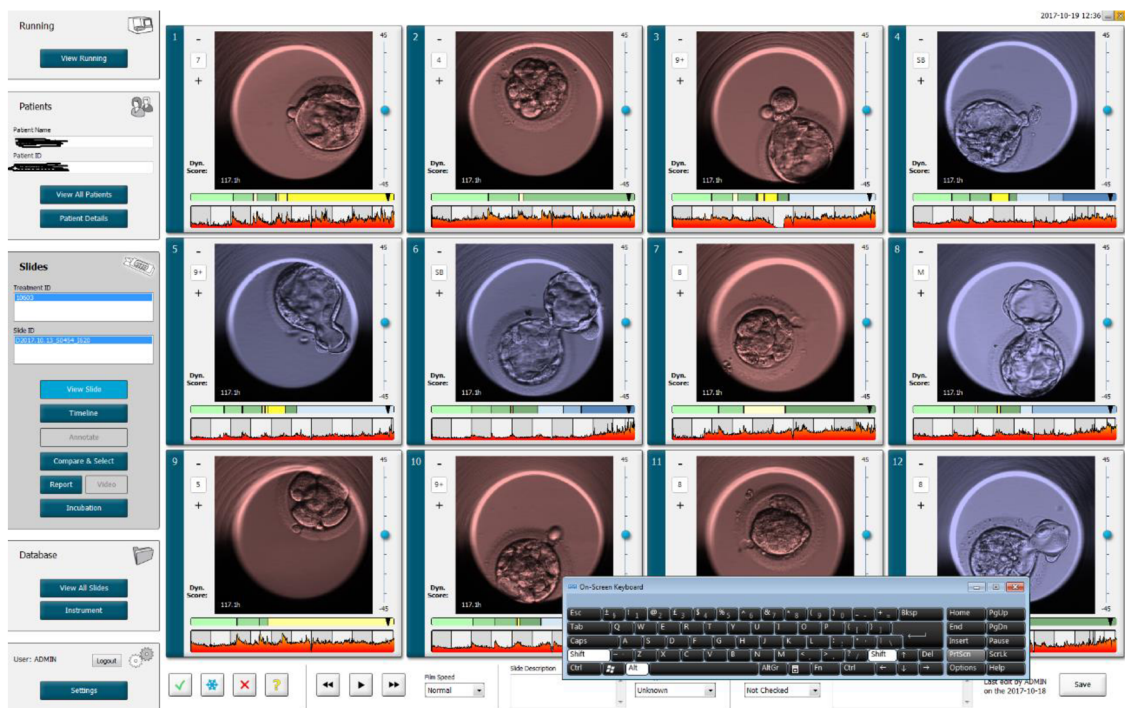
## Time-lapse monitoring a morfokinetické parametry

Pokud je potřeba hodnotit vývoj embryí kultivovaných v běžných kultivačních boxech, je třeba kultivovaná embrya přemístit z inkubátoru ven do laboratorního prostředí pod mikroskop nebo stereolupu. Tím je narušena stabilita jejich kultivace a embrya to může negativně ovlivnit ve vývoji (Lemmen *et al.*, 2008).

Time-lapse technologie je metoda vytváření snímků vyvíjejících se embryí v nastavených časových intervalech (10-20 minut). Doba světelné expozice je po celou dobu kultivace přibližně 0,5 s. Poskládáním snímků hodnotícím softwarem vznikne time-lapse sekvence, která dovolí posoudit načasování a synchronicitu časného mitotického dělení a také pozorovat embrya, u nichž je buněčné dělení abnormální (Obr. 10). Vzhledem k tomu, že kamera, která pořizuje snímky, je umístěna přímo v kultivačním boxu, je zaručeno stabilní prostředí pro embrya bez jejich vytahování z inkubátoru kvůli hodnocení pod mikroskopem v prostředí laboratoře. Nespornou velkou výhodou time-lapse monitoringu tedy je, že embrya jsou stále v optimálním kultivačním prostředí, nejsou vystavována kolísání teplot, pH, vlhkosti, koncentrace CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, jako při běžném hodnocení vývoje embryí pod mikroskopem (Kovacs, 2014, Casteló *et al.*, 2016).

Získané informace o rýhujícím se embryu mohou pomoci identifikovat embrya s vyšším potenciálem vyvinout se do stadia blastocysty (v případě kultivace jen do D2-D3) nebo obecně s vyšším implantačním potenciálem. Je to velmi užitečný nástroj, který embryologovi usnadní výběr embrya k ET a ke kryokonzervaci se zajištěním stabilních kultivačních podmínek (Dal Canto *et al.*, 2012; Kirkegaard *et al.*, 2013a).

V současnosti se hledají stále přesnější kritéria pro zdokonalení výběru kvalitního embrya. Kultivovaná embrya jsou posuzována z morfologického hlediska, hodnotí se načasování a synchronicita mitotického dělení, délka trvání buněčných cyklů. Embrya s prokázaným abnormálním dělením se obvykle vyřazují z dalšího použití (Meseguer *et al.*, 2011).



**Obr. 10.** Hodnocení embryí v time-lapse systému EmbryoScope, Vitrolife, (kopie monitoru EmbryoViewer, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín)

Mezi důležité morfokinetické parametry (Tab. 1, Obr. 11), které se sledují u vyvíjejícího se embrya patří zejména: cc2, což je doba mezi první a druhou mitózou (tj. doba mezi dvoubuněčným a třibuněčným embryem), s2 jako doba mezi druhou a třetí mitózou (tj. doba mezi třibuněčným a čtyřbuněčným embryem). Tyto parametry označila ve své práci Wong jako statisticky významné (Wong *et al.*, 2010) pro jejich účinnost při identifikaci embrya s vysokým potenciálem vyvinout se do stadia blastocysty, jelikož vždy nelze provést kultivaci embryí až do stadia blastocysty (do D5, D6) například z legislativních důvodů. Důležitým morfokinetickým parametrem se jeví i t5, který je definován jako doba do dosažení pětibuněčného embrya (Meseguer *et al.*, 2011). Pro embrya s prodlouženou kultivací do D5 nebo D6 jsou klíčové morfokinetické parametry k předpovězení implantačního potenciálu: iniciace kompaktace – tSC, začátek blastulace – tSB, čas dosažení plně expandované blastocysty – tEB (Campbell *et al.*, 2013).

Mezi vylučující parametry jsou řazeny zejména tzv. direct cleavage (přímé dělení), kdy se 1 buňka rozdělí přímo na 3 buňky, velmi krátká doba ve stadiu dvoubuněčného embrya (méně než 5 hodin), nepravidelné blastomery ve dvoubuněčném stadiu (více než 25 % rozdíl velikosti) (Meseguer *et al.*, 2011).

Vzhledem k tomu, že pro výběr kvalitního embrya je třeba použít obvykle více morfokinetických a morfologických parametrů jsou navrhovány stále nové a přesnější algoritmy pro výběr nejlepšího embrya. První algoritmus byl navržený na základě retrospektivní analýzy 247 embryí se známým implantačním statusem pro selekci embryí kultivovaných v time-lapse systému. Embrya byla klasifikována na základě morfologického hodnocení, vylučujících a zařazujících kritérií. Tento algoritmus zavedl nový způsob klasifikace a výběru embryí, který je úplnější, založený nejen na morfologickém posouzení, ale také na kinetických markerech – konkrétně t5, s2 a cc2 (Meseguer *et al.*, 2011).

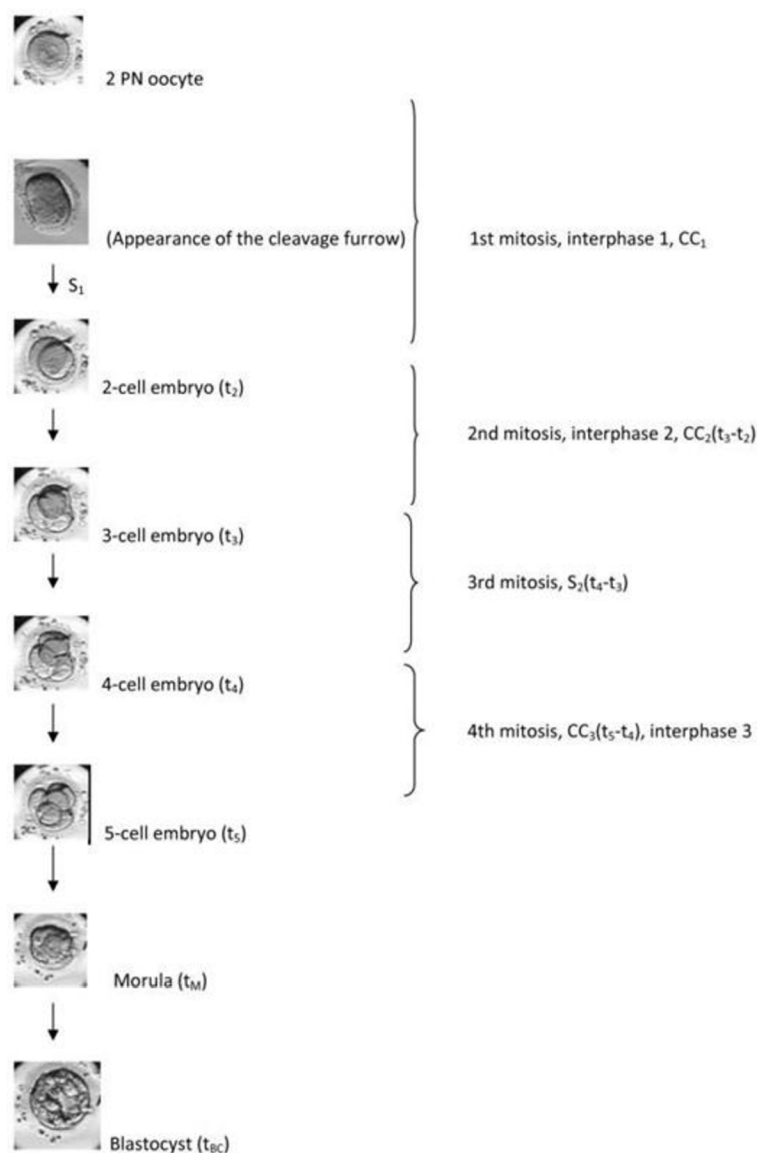
Jiný hierarchický model, ve kterém byl morfokinetický parametr s2 nahrazen parametrem t3 (doba, kdy se embryo rozdělí na 3 buňky), dále následuje hodnocení parametrů cc2 a t5, publikovala vědecká skupina kolem Natalie Basile (Basile *et al.*, 2015).

Goodman *et al.* (2016) představili další hierarchický model, kde se nejdříve určuje morfologická kvalita embryí a následně se použijí morfokinetické parametry (tPNf, t2, t4, t8, s1, s2, s3, cc2, tSB, tBL) k nalezení nejlepšího embrya k ET.

Petersen *et al.* (2016) svůj výsledný algoritmus KIDScore D3 Basic, založil na šesti anotacích vývoje embrya, které se skládaly z jedné morfologické a šesti morfokinetických událostí (2PN, tPNf, t2, t3, t4, t5, t8)

**Tab. 1.** Přehled morfokinetických parametrů:

t0	čas inseminace / fertilizace
tPB2	čas od inseminace do extruze 2. pólového tělíska u oplozeného oocytu
tPNa	čas od inseminace do objevení se prvojader
tPNf	čas od inseminace do syngamie prvojader
2PN, 1PN, 3PN	výskyt 2 prvojader, 1 prvojádra, 3 prvojader (hodnotí se v polovině doby od objevení se prvojader do jejich zmizení)
t2	čas od inseminace do rozdělení na 2 buňky
t3	čas od inseminace do rozdělení na 3 buňky
t4, t5, t6, t7, t8, t9	čas od inseminace do rozdělení na 4, 5, 6, 7, 8,9 buněk
cc1	doba trvání první mitózy, od t0 do t2, identická s t2
cc2	trvání druhé mitózy, interfáze 2, t3-t2
cc3	trvání čtvrté mitózy, interfáze 3, t5-t4
s1	první synchronizační parametr, rovná se 0, t2-t2, nepoužívá se
s2	druhý synchronizační parametr, trvání třetí mitózy, t4-t3
s3	třetí synchronizační parametr, t8-t5
tSC	čas od inseminace do začátku kompaktace
tM	čas od inseminace do vytvoření moruly
tSB	čas od inseminace do začátku blastulace
tB	čas od inseminace do vytvoření blastocysty
tEB	čas od inseminace do vytvoření expandované blastocysty
tHB	čas od inseminace do vytvoření hatchující blastocysty



**Obr. 11.** Vývoj embryí od 2PN do stadia blastocysty a používaná terminologie: Reproductive Biology and Endocrinology, Kovacs (2014).

V současnosti je v mnoha embryologických laboratořích stále velmi často používanou metodou hodnocení vyvíjejících se embryí jejich kontrola a morfologické hodnocení v určitých časových intervalech (například každých 24 hodin) pod binokulárním mikroskopem v prostorách embryologické laboratoře. Tento typ hodnocení a selekce má mnoho omezení a je spojován s protichůdnými reprodukčními výsledky, a to navzdory přijetí standardních kritérií pro hodnocení morfologie oocytů a embryí (Neuber *et al.*, 2003; Scott, 2007). V posledním desetiletí byly vyvinuty další metody selekce embryí, jejichž cílem je zlepšit klinické výsledky a obejít technická omezení, s nimiž se setkává klasické morfologické hodnocení embryí. Mezi tyto metody je řazeno morfokinetické hodnocení embryí s využitím časosběrného zobrazování

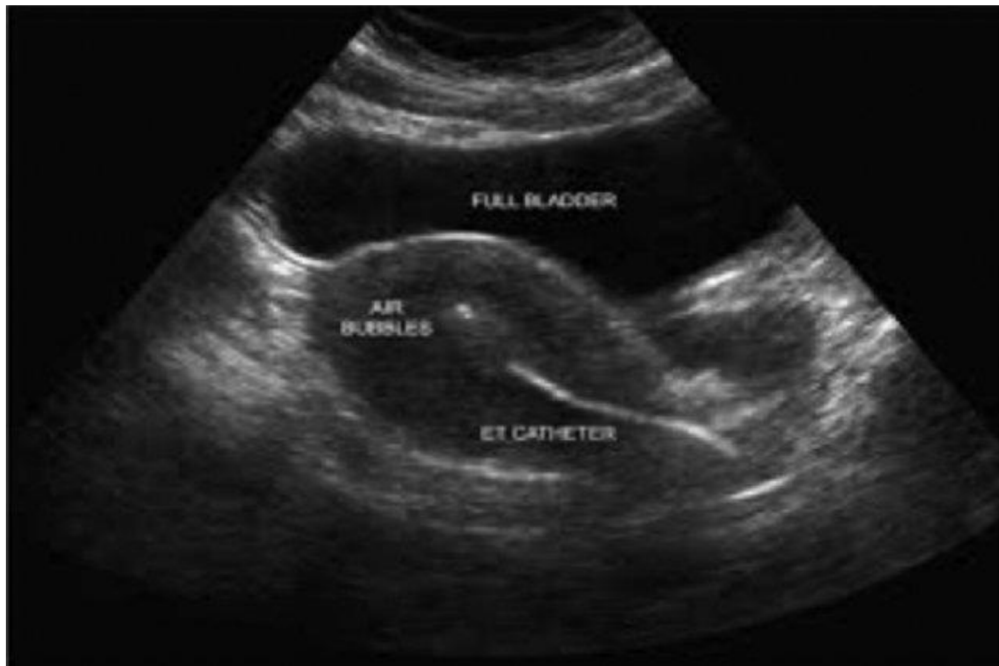
novými mikroskopickými systémy (time-lapse monitoring) (Castelló *et al.*, 2016) nebo hodnocení embryí mimo jiné na základě analýzy metabolismu embryí (Botros *et al.*, 2008).

## **ET - embryotransfer**

Embryotransfer je finálním krokem celého procesu IVF léčby. Spočívá v zavedení obvykle jednoho embrya pomocí speciálního katetru přímo do dělohy pacientky. Úspěšnost embryotransferu (celého IVF léčebného cyklu) se statisticky vyjadřuje jako procento klinicky těhotných pacientek na jeden ET - CPR (clinical pregnancy rate) nebo jako počet zárodečných váčků v děloze na jeden ET - IR (implantation rate) nebo počet živě narozených dětí na jeden ET - THBR (take home baby rate). Počet přenášených embryí do dělohy pacientky závisí na konkrétní situaci. Preferuje se přenos jednoho nejkvalitnějšího embrya, nedoporučuje se přenos více než dvou embryí. Dlouhodobě existuje snaha o snížení počtu transferovaných embryí a tím pádem i snížení počtu vícečetných těhotenství, která jsou vždy spojena se zvýšeným rizikem výskytu komplikací. Pacientky jsou proto motivovány k ET jednoho embrya (eSET) (Mardešić *et al.*, 2013).

Vlastní provedení ET může být na různých pracovištích částečně odlišné. Základní čtyři fáze jsou: výběr embrya k ET embryologem, nasátí embrya do speciálního transferového katetru, příprava pacientky k ET na zákrovém sále a zavedení embrya do dělohy. Vybrané embryo je přenášeno v malém množství kultivačního média ve speciálním transferovém katetru. Obvykle je katetr složen ze dvou částí – vlastního katetru a zavaděče, který usnadňuje průnik přes děložní hrdlo. Embryolog předem vybrané embryo pod vizuální kontrolou pod binokulární lupou ve sterilním laminárním boxu nasaje opatrně do katetru. Obvykle je embryo umístěno na konci katetru mezi bublinkami vzduchu, které jsou dobře viditelné v UZ zobrazení. Manipulace s katetrem musí být naprosto sterilní, aby se do dělohy pacientce nepřenese infekce. Transfer by měl proběhnout co nejrychleji, aby embryo nebylo dlouho vystaveno změnám teploty, pH nebo expozici světla. Vlastní ET probíhá na zákrovém (operačním) sále ve sterilních podmínkách. Pacientka je na operačním sále uložena na gynekologické lůžko. Lékař ji nejdříve zavede gynekologická zrcadla a poté otře děložní čípek sterilním fyziologickým roztokem. Poté gynekolog přes děložní hrdlo zavede zavaděč. Jakmile je pacientka připravena přinese embryolog katetr s nasáтым embryem. Buď oba společně nebo jen lékař aplikuje

stlačením pístu stříkačky malý objem kultivačního roztoku i s embryem do dělohy pacientky (obvykle 1-2 cm pod fundus dělohy). Transfer může být kontrolován pomocí ultrazvukové abdominální sondy a může být vizualizován na monitoru (Obr. 12). Viditelné jsou pod UZ vzduchové bublinky umístěné v katetru v blízkosti embrya nebo samotný konec katetru může být kontrastní pro UZ (Gardner *et al.*, 2012).



**Obr. 12.** Monitorování embryotransferu pomocí abdominální ultrazvukové sondy, je patrný transferový katetr a jsou viditelné vzduchové bublinky ve fundu dělohy (Woolcott R, Stanger J., 1997).

### **Kryokonzervace gamet a embryí**

Kryokonzervace gamet a embryí je metoda, která v současnosti neodmyslitelně patří k IVF léčbě, zejména díky zdokonalené kultivaci embryí a tím pádem nadbytku kvalitních embryí, které je možné zamrazit a uchovat pro další použití. Základem kryokonzervace je snížení míry poškození vlivem intracelulární tvorby ledu (Ostró *et al.*, 2009). Ledové krystaly se mohou tvořit vně i uvnitř buněk a mohou mechanicky narušit buněčnou membránu. Rizikem pro embrya a gamety je také dehydratace, proto jsou buňky během procesu kryokonzervace chráněny roztoky s kryoprotektivy. Kryoprotektiva jsou chemické látky rozpustné ve vodě s různou molekulovou hmotností. Jejich účinek spočívá ve snížení krystalizační teploty roztoku a redukci vzniku intracelulárních ledových krystalů, tím že



maximálně odvodní buňku a nahradí vodu v buňce kryoprotektivními molekulami. Ty stabilizují buněčné struktury a buněčnou membránu. Embrya mohou být během kryokonzervace poškozena v důsledku intracelulární tvorby krystalů ledu, chemické toxicity kryoprotektiv, osmotického nabobtnání, prasknutí (fraktury) nebo extracelulární krystalizace. Kryoprotektiva jsou dvojího typu: penetrující (intracelulární) a nepetrenující (extracelulární) buněčnou membránu. Penetrující kryoprotektiva jsou malé molekuly, které mohou projít přes buněčnou membránu vlivem rozdílné koncentrace látek uvnitř a vně buňky. Voda z buňky je vytlačována ven a je nahrazována látkami kryoprotektiv. Během výměny roztoků dochází k lehkému smršťování buněk. Buňky by neměly být účinkům kryoprotektiv vystavovány příliš dlouhou dobu, to by pak vedlo k prudké dehydrataci, deformaci, intoxikaci až buněčné smrti. Mezi nejčastěji používaná kryoprotektiva je řazen etylenglykol, glycerol, dimethylsulfoxid, 1,2-propandiol. Nepetrenující kryoprotektiva jsou velké molekuly, většinou cukry, proteiny a polymery, které neprocházejí buněčnou membránou a mají osmoticky dehydratační účinek, tzn. že zůstávají vně buňky a zvyšují osmotický tlak v roztoku. Tím se se zrychluje dehydratace buněk. Nepenetrující kryoprotektiva jsou méně toxické pro buňky. Nejvíce používaná je sacharóza, manitol, sorbitol, trehalóza, polyvinylpyrrolidon a polyvinylalkohol (Bhattacharya, 2018).

V současnosti se ke klinickému použití v IVF léčbě používá tzv. pomalé mražení (slow freezing) a vitrifikace. Pomalé mražení byla silně převažující metoda kryokonzervace po celé 80. a 90. léta dvacátého století a v prvních deseti letech 21. století (Rezazadeh *et al.*, 2009).

Principem pomalého mrazení je pomalé ochlazování vzorku, zejména embryí. Mrazení oocytů pomalým mrazením nebylo příliš úspěšné a efektivní. Vzorek je ochlazován z laboratorní teploty až do  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ . K tomuto účelu slouží speciální mrazící přístroj (např. Planer), který sestává z počítačové jednotky řídící proces ochlazování, mrazící komory a zásobníku s tekutým dusíkem. Před vlastním umístěním vzorku do mrazícího přístroje musí být inkubován v sérii roztoků s kryoprotektivou (penetrujícími i nepenetrujícími). Při pomalém mrazení jsou používány roztoky s nižší koncentrací kryoprotektiv, ale je aplikována delší doba inkubace v jednotlivých kryomédiích. Z posledního, nejvíce koncentrovaného roztoku jsou embrya nasáta do speciální kryoslámky (pejety, straw), jejíž oba konce je nutné zatavit, pak je možné vložit pejetu do chladicí komory mrazícího přístroje. Maximální objem média v pejetě s embryi je 200  $\mu\text{l}$ . Každá pejeta je řádně označena jménem pacientky a dalšími důležitými

údaji. Bod mrznutí vody je 0 °C, nicméně vodné roztoky spontánně mrznou až kolem – 20 °C. Aby byl proces tvorby ledových krystalů kontrolovaný, je třeba při dosažení teploty - 7 °C tzv. seeding (očkování), tzn. v místě, kde nejsou přímo umístěna embrya, je nutné se pejety dotknout podchlazenou pinzetou (namočenou do tekutého dusíku) a tím se v místě dotyku nastartuje vznik ledových krystalů. Standardní kryoprotokol vypadá následovně: ochlazování 2 °C / minutu až do teploty - 7 °C, poté je teplota na 5-10 minut stabilizována a je proveden manuální seeding, následující fáze je pro embrya kritická, a proto je vzorek ochlazován 0,3 °C / min až do teploty - 30 °C, další ochlazování je už rychlejší, až - 30 °C / min a při dosažení teploty - 150 °C je pejeta vyjmuta z mrazicí komory a rychle přesunuta do skladovacího kryokontejneru s tekutým dusíkem. Celý proces mrazení trvá 2,5 – 3,0 hodiny (Řezáčová *et al.*, 2018).

Rozmrazení pak probíhá ponořením pejety s embryi do vodní lázně (30 °C) a vypuštění rozmrzlého roztoku s embryi do prvního inkubačního média. Postupně jsou rozmrazovaná embrya přesouvána do dalších inkubačních roztoků se sestupnou koncentrací kryoprotektiv. Buňky je třeba tímto procesem hydratovat a obnovit tak vitální funkce (Rienzi *et al.*, 2017).

V posledních 15 -ti letech v České republice i jinde ve světě přibývá IVF cyklů s použitím vitrifikace. Vitrifikace je velmi rychlý způsob kryokonzervace, kdy jsou mrazené vzorky (embrya, oocyty, spermie, ovariální tkáň nebo testikulární tkáň) po cílené dehydrataci rovnou ponořeny do tekutého dusíku. K tomuto procesu není třeba žádného přístrojového vybavení, je však mnohem citlivější na přesnost a preciznost práce embryologa (Trávník, 2018).

Principem vitrifikace je velmi rychlé zmrazení buněk ve velmi malém objemu média na speciálních nosičích. Rychlost zmrazení zabraňuje vzniku ledových krystalů a vzniká amorfni sklovitá hmota. Před vlastním zamrazením je nutné inkubovat buňky v kryomédiích, které mají vyšší koncentraci kryoprotektiv obou typů než u pomalého mražení. Doba vystavení nejvíce koncentrovanému roztoku může být maximálně 60 sekund, do té doby musí být mrazené buňky umístěny na speciální nosič v objemu maximálně 0,1 - 2,0 µl a ponořeny do tekutého dusíku. Rychlost mrazení je 10 000 °C / min. Existuje otevřený a uzavřený systém vitrifikace. V otevřeném systému jsou buňky přímo vystaveny tekutému dusíku. V uzavřeném systému je nosič se vzorkem nejdříve vložen do vychlazeného obalu, po zatavení konců pak do tekutého dusíku (Vajta & Nagy, 2006).

Rozmrazení probíhá přímým vložením nosiče se vzorkem do vyhřátého média, přičemž přenos z tekutého dusíku do média musí být v rozmezí 1 až 2 sekund. Buňky jsou pak inkubovány v roztocích s klesající koncentrací kryoprotektiv a poté dokultivovány v klasických kultivačních médiích (Rienzi *et al.*, 2017).

Skladování zamrazených buněk je realizováno v Dewarových nádobách (dvouplášťová nádoba) s tekutým dusíkem s různých závěsných systémech obvykle v barevných plastových gobletech. Vnitřní teplota v Dewarově nádobě může být monitorována tepelnými čidly (Obr. 13, Obr. 14).



**Obr. 13.** Skladovací Dewarova nádoba s objemem 240 litrů  $\text{IN}_2$  (Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín)



**Obr.14.** Kryosklad Kliniky reprodukční medicíny a gynekologie Zlín

## **Kryoembryotransfer**

Kryoembryotransfer je zavedení rozmrazených kryokonzervovaných embryí do dělohy pacientky. Po vlastním rozmrazení se embrya obvykle ještě minimálně 2 hodiny kultivují, aby dosáhla plné hydratace a obnovily se vitální funkce. Úspěšnost léčby po provedení kryokonzervace, rozmrazení a zavedení embrya/í do dělohy je srovnatelná s úspěšností léčby čerstvými embryi, zejména díky používání vitifikace v posledních desíti letech (Vajta *et al.*, 2015; Rienzi *et al.*, 2017).

## **Preimplantační genetické testování**

Biologicky nejpravděpodobnějším a nejslibnějším prostředkem selekce embryí zůstává hodnocení jejich genetické složky po biopsii buněk trofektodermu embrya, což je proces známý jako preimplantační genetické testování (PGT). První hlášená těhotenství po PGT s použitím techniky fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se objevila v roce 1995 a od té doby se její klinické využití dramaticky zvýšilo. PGT bylo použito v IVF pro různé indikace, kde bylo vysoké riziko aneuploidíí embryí, zejména pokročilý věk matky, opakované selhání implantace, opakovaný potrat nebo těžká mužská neplodnost. PGT je vyšetření obvykle pětidenních až šestidenních embryí s cílem nalézt chromozomální nebo genové abnormality, které by po zavedení embrya do dělohy pacientky mohly vést ke vzniku genetické vady u plodu nebo k zastavení gravidity (Brezina *et al.*, 2016).

Nejvíce je využíváno vyšetření aneuploidíí (PGT-A), translokací či jiných chromozomálních přestaveb (PGT-SR) nebo při potvrzení monogenní choroby (PGT-M) u rodičů. První genetické vyšetření lidského embrya bylo provedeno v roce 1990 (Handyside *et al.*, 1990).

## **Biopsie buněk trofektodermu**

Pro účely genetického vyšetření embryí je nutné z nich odebrat několik buněk. V současnosti je odběr prováděn standardně pomocí laseru z trofektodermu embrya pátý až šestý den kultivace (embryo je ve stadiu blastocysty, expandované blastocysty, hatchující blastocysty). Embryo se již neskládá z totipotentních blastomer, ale je diferencované na dvě

odlišné buněčné struktury – trofektoderm, z kterého se později vyvíjí placenta a vnitřní buněčnou masu, z které vzniká vlastní zárodek. Ideálním vzorkem pro genetické vyšetření je 5-10 bioptovaných buněk TE (Adler *et al.*, 2014).

Celá procedura spojená s odběrem buněk probíhá pod invertovaným mikroskopem pomocí mikromanipulátoru. Prvním krokem biopsie TE je otevření *zona pellucida*, což je glykoproteinový obal chránící vajíčko, posléze časně embryo. Existují dva přístupy otevření *zona pellucida* před biopsií: zonu lze otevřít předem ve stadiu cca 8buněčného embrya a nechat trofoblast postupně samovolně vyhřeznout nebo je možné u expandované blastocysty zonu otevřít a trofoblast bioptovat zanořením bioptické pipety pod *zona pellucida* (Aoyama & Kato, 2020; Xiong *et al.*, 2021a).

Druhý postup umožňuje lepší lokalizaci otvoru vůči ICM. Vyhřezlý TE je nasán do bioptické pipety a lehce natažen, pomocí laseru nebo mechanicky, či kombinací obou, je oddělen tak, aby se získalo 5 trofektodermálních buněk (Obr. 15) (Aoyama & Kato, 2020).

Bioptované buňky se pak propláchnou ve sterilním pufu a umístí do PCR zkumavky, zmrazí při teplotě -20 °C a předají k dalšímu zpracování do molekulárně genetické laboratoře. Při odběru buněk TE ke genetickému vyšetření na D5 nebo D6 je vhodné bioptovaná embrya po tomto zákroku kryokonzervovat ideálně do 1 hodiny po provedení biopsie (Miki *et al.*, 2022) a transferovat je až v dalším menstruačním cyklu pacientky – důvodem je složitost genetické analýzy, která je časově náročná a nestihne se provést v řádu hodin, aby bylo možné vyšetřené embryo ještě v tomtéž cyklu zavést pacientce do dělohy (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, 2020).



**Obr.15.** Biopsie buněk trofektodermu pomocí bioptické pipety a laseru, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín

## **PGT-A preimplantační genetické testování aneuploidií**

Preimplantační genetické testování aneuploidií se provádí z více indikací. Jedná se zejména o případy, kdy má pacientka více než 35 let, opakuje se u ní selhání fertility, opakují se těhotenské ztráty v prvním trimestru, u partnera je diagnostikován abnormální výsledek spermogramu. Zásadní pro indikaci PGT-A jsou aborty s prokázanými chromozomálními vadami v předchozích těhotenstvích nebo gonozomální mozaiky. Podstoupená onkologická léčba je také indikací k PGT-A (ESHRE PGT Consortium Steering committee. *et al.*, 2020).

Velmi diskutovanou je v současnosti otázka embryonálního mozaicismu, kdy u 5-10 % embryí nemusí výsledky biopsie TE, který se v dalším vývoji embrya stává placentou, reflektovat chromozomální stav vnitřní embryonální masy. Záchyt mozaiky některé aneuploidie se zpřesnil používáním metody NGS (Next Generation Sequencing, viz níže). Podle současných doporučení ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) pro screening aneuploidií metodou NGS se za euploidní považuje embryo se záchytem mozaiky aneuploidie do 20 %, za aneuploidní embryo se záchytem mozaiky nad 80 % (Munné & Wells, 2017). Aneuploidie mohou vést k selhání implantace, potratům a také k vrozeným vadám plodu (Macklon *et al.*, 2002).

## **PGT-M preimplantační genetické testování monogenních chorob**

V současnosti je znám molekulární podklad a způsob dědičnosti téměř u 6000 genetických chorob. U 1 dítěte z 300 se vyskytne monogenní choroba. Pro páry s diagnostikovanou monogenní chorobou je preimplantační vyšetření embryí pomocí PGT-M a jejich následná selekce pro KET řešením, jak počít zdravé dítě. Metodou karyomapping je možné detekovat embrya s kauzální mutací, ale i s výskytem aneuploidií. Indikací k PGT-M je pak výskyt monogenní choroby v rodině, zejména pokud se jedná o onemocnění s vážnými zdravotními následky (Řezáčová *et al.*, 2018).

## **PGT-SR preimplantační genetické testování strukturálních chromozomálních přestaveb**

Pacienti, kteří jsou nosiči některých strukturních chromozomových aberací (translokací Robertsonských, reciprokých nebo inverzí) tvoří v určitém zastoupení gamety

s nebalancovaným genetickým materiálem a z těchto gamet mohou vzniknout nebalancovaná embrya. U párů, kde je jeden rodič přenašeč translokace nebo inverze je mnohonásobně vyšší riziko potratů. Cílem vyšetření pomocí PGT-SR je výběr embrya s balancovaným genotypem. Zároveň se embrya vyšetřují na výskyt aneuploidii (Slabý, 2015).

## **Metody genetického vyšetření**

Původně se preimplantační genetické vyšetření provádělo pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace). FISH je molekulárně genetická metoda umožňující lokalizaci a identifikaci specifických úseků DNA. Na DNA přítomnou ve vzorku se za určitých podmínek váže (hybridizuje) jednovláknová DNA (300 – 600 bp) značená fluorescenční značkou - tzv. sonda. Tato sonda se specificky váže na DNA s komplementární, přesně opačnou sekvencí. Chceme-li detekovat, zda je přítomný určitý chromozom nebo jeho část, použijeme sondu obsahující sekvenci nukleotidů odpovídající hledanému úseku. Sonda se naváže v tolika kopiích, kolik kopií je přítomno ve vyšetřovaném vzorku. Počet kopií je detekováno ve fluorescenčním mikroskopu jako počet fluorescenčních signálů v jádře. Obměnou FISH jsou další metody, například mnohobarevná FISH umožňující vybarvit každý chromozom specifickou barvou, a tím detekovat i drobné strukturní změny (Beránek, 2016). Historicky byly používány sondy k maximálně 9 chromozomům (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y). První FISH na lidské blastomeře z třídenního embrya provedl Munné *et al.* (1993), se sondami pro chromozomy 13, 18, 21, X, Y.

Jednou z metod příbuzných FISH je komparativní genomová hybridizace (CGH), hybridizace na speciálním čipu je pojmenována array CGH. Je schopna detekovat aneuploidie a nebalancované přestavby chromozomů. U této metody slouží jako sonda fluorescenčně označená DNA celého genomu vyšetřované tkáně. Takto označená DNA (například červeně) se porovnává se srovnávací DNA, která je označena jinou barvou (například zeleně). Obě DNA se smíchají v poměru 1:1 a hybridizují se na fyziologické chromozomy. Změna barvy fluorescence je počítačově vyhodnocena. Je-li ve vyšetřované DNA přítomno zmožení (amplifikace) genu, či části DNA sekvence, převažuje v odpovídající části chromozomu červená fluorescence. Je-li přítomna delece (ztráta) genu, či DNA sekvence, převažuje ve výsledné oblasti chromozomu zelená fluorescence (Beránek, 2016). Předpokladem pro aplikaci CGH je

předběžné zpracování vzorku zahrnující izolaci DNA a její celogenomovou amplifikaci – WGA (např. metodou MDA, multiple displacement amplification) (Řezáčová *et al.*, 2018).

Metodou karyomapping lze zjistit celou řadu genetických změn. Je založena na čipové technologii a využívá SNP (jednonukleotidový polymorfismus, single-nucleotide polymorphism). Jednotlivé snipy jsou na základě analýzy DNA u rodičů a referenčního vzorku uspořádány do haplotypů, které odpovídají pořadí snipů na jednotlivých chromozomech (Řezáčová *et al.*, 2018). Karyomapping využívá nepřímou DNA diagnostiku, umožňuje PGT všech monogenních onemocnění se známou kauzální mutací, současně umožňuje detekovat aneuploidie v jediném vzorku (Konstantinidis *et al.*, 2015).

Sekvenování nové generace (NGS) využívá principu paralelního sekvenování DNA, kdy se provádí tisíce až miliony sekvenací současně. Probíhá ve dvou krocích – příprava DNA knihovny a vlastní čtení sekvence v sekvenátoru. Při detekci aneuploidií má NGS ve srovnání s aCGH větší dynamický rozsah, umožňuje přesně kvantifikovat mozaicismus ve vzorku (Rubio *et al.*, 2017). Metoda je vhodná i pro vyšetření embryí u párů, kde jeden z rodičů je přenašeč balancované translokace nebo inverze, záleží na velikosti translokovaných úseků a citlivosti použité diagnostické soupravy (Mardešić, 2013).



## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Soubor pacientek

Pro vypracování této disertační práce byla použita data z období od ledna 2016 až do června 2021. Tato retrospektivní kohortová studie je založena na datech z databáze Kliniky reprodukční medicíny a gynekologie Zlín. Do studie byly zahrnuty pacientky, které podstoupily na Klinice reprodukční medicíny a gynekologie Zlín IVF léčbu s preimplantačním genetickým testováním embryí (konkrétně s preimplantačním genetickým testováním aneuploidií, PGT-A) a kultivací embryí v time-lapse systému EmbryoScope (Vitrolife, Švédsko). Pacientek zařazených do studie bylo celkem 296, průměrný věk byl  $32,7 \pm 4,5$  roků. Indikací k PGT-A byl většinou vyšší věk pacientky (nad 35 let), potraty nebo implantační selhání v předchozích IVF cyklech. Do studie bylo zahrnuto celkem 1027 morfoloicky kvalitních embryí, z toho 552 geneticky normálních embryí (euploidních) a 475 geneticky abnormálních (aneuploidních) embryí. Vlastní biopsie trofektodermy byla provedena u všech kvalitních embryí pátý nebo šestý den kultivace, požadovaná kvalita embryí byla 4AA, 4AB, 4BA, 5AA, 5AB, 5BA, 6AA, 6AB, 6BA dle Gardner a Schollcraft (Gardner *et al.*, 2000).

### 4.2 Odběr a kultivace oocytů a embryí

Ovariální stimulace a odběr oocytů byl proveden podle standardních léčebných protokolů. Ve většině případů byla stimulace vaječnicků realizována pomocí GnRH antagonistického protokolu, k indukci ovulace byl aplikován Decapeptyl nebo Dipherelin a odběr oocytů byl proveden pod UZ kontrolou za 36 hodin od aplikace tohoto triggeru. Odběry oocytů byly provedeny na operačním sále kliniky ve sterilních podmínkách pod celkovou anestezií pacientky. Odběr oocytů standardně provádí gynekolog – IVF specialista pomocí dlouhé sterilní aspirační jehly (Tik, Slovinsko), která je přichycena k vaginální ultrazvukové sondě. Jehla je pomocí hadičky napojena na odsávačku s nastavitelnou silou podtlaku (Aspirator4014, Labotect, Německo). Folikulární tekutina s oocyty se pod ultrazvukovou kontrolou odsává po vpichu jehly přes vaginální stěnu do folikulů. Folikulární tekutina je sbírána zdravotní sestrou do sterilních zkumavek (Gama, 15 ml, Česká republika) a ihned předávána do embryologické laboratoře. Embryologem je folikulární tekutina v laboratoři přenášena do sterilních plastových Petriho misek o průměru 60 mm (Thermo Scientific Nunc,

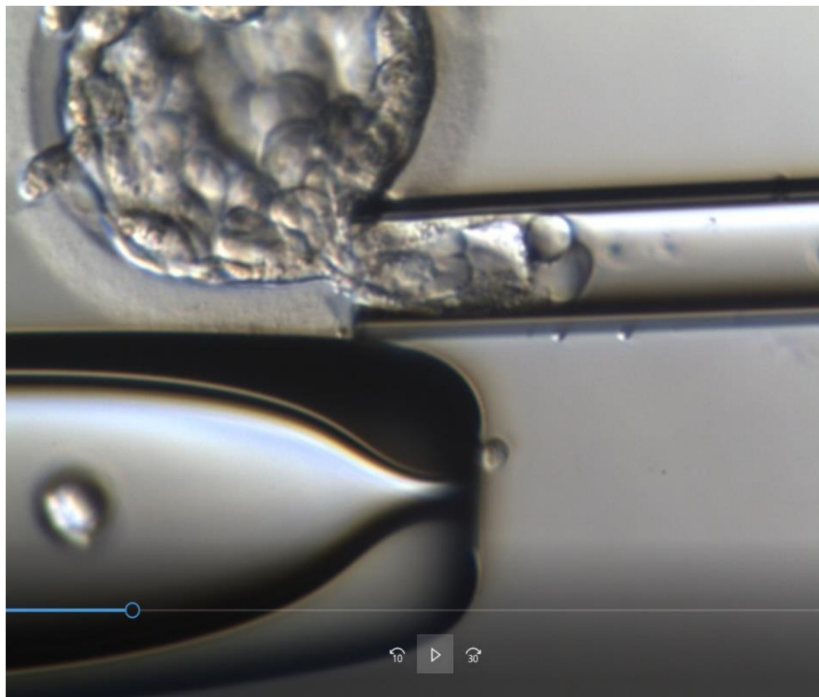
Finsko) a pod stereolupou (Nikon, Japonsko, zvětšení 10x až 100x) jsou v ní hledány oocyty ve formě kumulo-oocytárních komplexů (COC). Všechny nalezené COC jsou umísťovány pomocí pipety se sterilní špičkou (Eppendorf) do sběrné koncentrické misky o průměru 60 mm (Thermo Scientific Nunc, Finsko) s manipulačním médiem (Sydney IVF Gamete Buffer, Cook Medical, USA). Po prohlédnutí veškeré odebrané folikulární tekutiny jsou vajíčka spočítána, propláchnuta ve fertilizačním médiu (Sydney IVF Fertilisation Medium, Cook Medical) a uložena v kultivační 4-komůrce (Thermo Scientific Nunc, Finsko) v 1,0 ml fertilizačního média (Sydney IVF Fertilisation Medium, Cook Medical, USA) převrstveného 0,5 ml minerálního oleje (Ovoil, Vitrolife, Švédsko) do kultivačního boxu (K-Systems G210 InviCell, CooperSurgical, Dánsko).

Všechny oocyty byly denudovány 2 hodiny po odběru promýváním v hyaluronidáze (HYASE-10X, Vitrolife, Švédsko) pomocí jednorázových denudačních a manipulačních skleněných pipet různých průměrů (Microtech, ČR). Po dokonalém odstranění kumulárních buněk bylo možné pod stereolupou (Nikon, Japonsko) zjistit jejich zralost. Pro ICSI / PICSI bylo možné použít oocyty ve fázi MII (profázi druhého meiotického dělení). Fertilizace (ICSI/PICSI) byla provedena 4 hodiny po odběru oocytů. Po provedení fertilizace byly všechny oocyty umístěny do kultivační misky EmbryoSlide (Vitrolife, Švédsko), kde byl každý oocyt umístěn do samostatné jamky. Všechny oocyty / embrya byla kultivována individuálně v kultivační misce s jednokrokovým médiem GTL (Vitrolife, Švédsko). Kultivační miska byla převrstvena 1,5 ml minerálního oleje (Ovoil, Vitrolife, Švédsko). Embrya byla kultivována pět až šest dní v time-lapse systému (EmbryoScope, Vitrolife, Švédsko) při teplotě 37 °C, 6 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> do stadia blastocysty či expandované blastocysty. Třetí den kultivace byl proveden laserem (OCTAX, Microscience GmbH; Bruckberg, Německo) asistovaný hatching, aby se otevřela *zona pellucida* a trofektoderm mohl herniovat ven. Pátý nebo šestý den kultivace, jakmile embrya dostatečně herniovala ze *zona pellucida* (minimálně 10 buněk), bylo bioptováno z každého vhodného embrya 5-10 bb pomocí laseru OCTAX.

#### **4.3 Biopsie buněk trofektodermu**

Vlastní biopsie buněk trofektodermu byla provedena na invertovaném mikroskopu Nikon Ti-U s pomocí mikromanipulačních nástrojů (Holding a Biopsy Needle, Microtech, ČR) a

pomocí laserových pulzů (OCTAX). Bioptované embryo bylo umístěno do ICSI misky o průměru 50 mm (Thermo Scientific Nunc, Finsko), do kapky manipulačního média a kapka byla převrstvena minerálním olejem. Pod mikroskopem bylo embryo přichyceno naproti herniaci TE buněk holding pipetou a herniované buňky lehce aspirovány do bioptické pipety. Poté byla herniovaná část lehce natažena a byly aplikovány 2-4 pulzy laserem, vždy do prostoru, kde se dotýkají sousední buňky. Lehkým tahem byla vyvinuta snaha buňky odtrhnout od embrya. Pokud TE buňky nebylo možné oddělit tímto způsobem, byla herniovaná část embrya aspirována celá do bioptické pipety a embryo bylo puštěno z držení holding pipety. Poté byly postaveny mikromanipulační nástroje přesně proti sobě a lehce přes sebe (v jedné rovině) a rychlým pohybem bioptické pipety směrem dolů přes holding pipetu (Obr.16) byla aspirovaná část embrya oddělena (tzv. flicking technika) (Aoyama & Kato, 2020).



**Obr.16.** Postavení mikromanipulačních nástrojů před vlastním oddělením TE buněk od embrya technikou „flicking“, Klinika reprodukční medicíny a gynekologie Zlín

Po biopsii bylo embryo umístěno zpět do kultivační misky na svou původní pozici do time-lapse inkubátoru. Bioptovaná část embrya byla pod stereolupou pomocí manipulační skleněné pipety (Microtech, ČR) dle standardního protokolu propláchnuta v několika kapkách PVP pufru (1% polyvinylpyrrolidon) a poté s minimem manipulačního média byla umístěna do

předchystané sterilní PCR mikrokumavky s 2  $\mu$ l PVP pufru. Poté byl bioptovaný vzorek zamražen při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Celý proces byl proveden se všemi vhodnými embryi dané pacientky. Po ukončení práce v embryologické laboratoři byly bioptované vzorky předány do akreditované molekulárně genetické laboratoře.

Maximálně do 60 minut po odběru buněk TE byla embrya zamrazena – vitrifikována (Xiong *et al.*, 2021b) ve vitrifikačním médiu Rapid VitBlast (Vitrolife, Švédsko) dle doporučení výrobce.

#### **4.4 Genetické vyšetření**

V molekulárně genetické laboratoři byla provedena izolace a celogenomová amplifikace DNA metodou SurePlex (SurePlex DNA Amplification system, Illumina). Získaný vzorek DNA o výsledné koncentraci cca 50 ng/ $\mu$ l byl vyšetřen pomocí arrayCGH (značení DNA, hybridizace na čipu - 24sure+, BlueGnome, Illumina, analýza pomocí softwaru BlueFuse Multi) nebo byl chromozomální profil vzorků stanoven metodou NGS (VeriSeq PGS Kit, Illumina). Principem metody je příprava sekvenační knihovny, kdy jsou jednotlivé vzorky označeny pomocí specifických indexů. Tato knihovna je následně amplifikována a sekvenována metodou SBS (MiSeq, Illumina). Získaná data byla vyhodnocena prostřednictvím softwaru BlueFuse Multi v4.5.

#### **4.5 Time-lapse monitoring**

U všech embryí, u kterých bylo provedeno PGT, byl analyzován obrazový záznam z time-lapse inkubátoru EmbryoScope, který pořizoval jednotlivé snímky každých 10 minut v 7 fokálních rovinách. Pomocí softwaru EmbryoViewer byly vyhodnoceny a zaznamenány všechny známé morfokinetické a morfologické údaje. Pro tuto práci byly použity morfokinetické parametry: cc2 - délka trvání druhého buněčného cyklu, s2 - délka trvání třetí mitózy (doba mezi rozdělením 3-buněčného embrya na 4-buněčné embrya), t5 - doba do rozdělení embrya na 5-ti buněčné embrya, tSB - doba do začátku blastulace. Čas rozdělení buněk je okamžik, kdy je vytvořena kompletní přepážka z cytoplazmatické membrány a dvě nové blastomery jsou úplně odděleny. Čas iniciace blastulace (tSB) je okamžik, kdy se vytvoří

první dutinka blastocoelu mezi buňkami embrya. Dále byl hodnocen výskyt multinukleací u blastomer ve dvoubuněčném a čtyřbuněčném embryonálním stadiu, přičemž za embryo s multinukleacemi bylo považováno každé embryo s multinukleacemi minimálně v jedné blastomeře. Anotace prováděl celou dobu jeden stejný zkušený embryolog.

#### **4.6 Kryoembryotransfer**

Výsledky genetického vyšetření byly standardně doručeny do embryologické laboratoře do 2-3 týdnů. Pacientka byla o výsledku informována a pokud disponovala geneticky normálními embryi začala se od začátku následujícího menstruačního cyklu připravovat ke kryoembryotransferu. Příprava ke KET byla buď použitím HRT substituce (hormone replacement therapy) – od 1. dne menstruačního cyklu začala užívat estrogenery (Estrofem) a od 3. dne také transdermální kožní estrogenový sprej (Lenzeto). Standardně 13. den cyklu byla zkontrolována výška endometria ultrazvukem a pokud bylo vyšší než 7 mm pacientka začala užívat gestageny (Amelgen, Utrogestan). Na 5. nebo 6. den užívání gestagenů byl pak naplánován KET, záleželo na stáří zamrazeného embrya (D5, D6). Druhý typ přípravy ke KET byl pomocí tzv. nativního cyklu – pacientka neužívala žádné hormonální přípravky, 13. den cyklu jí byla změřena výška endometria. Pokud bylo endometrium vyšší než 7 mm a dominantní folikul větší než 15 mm začala pacientka od následujícího dne užívat gestageny. KET byl obdobně naplánován za 5 nebo 6 dní od začátku užívání gestagenů, podle stáří embrya.

Každé pacientce bylo zavedeno jedno morfologicky nejlepší geneticky normální embryo. Vlastní rozmrazení (warming) bylo realizováno 3 hodiny před zavedením embrya do dělohy. Rozmrazení embrya bylo provedeno dle pokynů výrobce, analogicky k zamrazení, jen v opačném pořadí kryokonzervačních médií. Rozmrazované embryo se během promývání v roztocích s klesající koncentrací kryoprotektiv zpět hydratovalo. Po promytí v posledním roztoku a uběhnutí určeného časového intervalu bylo embryo přemístěno do misky s kultivačním médiem (Sydney IVF Blastocyst Medium, Cook Medical, USA) a překrytého minerálním olejem. Tato miska byla umístěna do standardního kultivačního boxu. Po dvou hodinách od rozmrazení byla provedena kontrola, zda se celé embryo rozmrazilo bez problémů a zda už započal proces zvětšování blastocoelové dutiny (embrya ve stadiu blastocysty se obvykle mrazí ve zkolabovaném stavu).

Vlastní kryoembryotransfer byl proveden na operačním sále, kde se pacientka připravila na operačním lůžku do gynekologické polohy. Gynekolog po dezinfekci vaginy a děložního čípku umístil přes děložní hrdlo do dělohy zavaděč katetru. Poté embryolog přinesl katetr s embryem, které bylo umístěno na konci katetru v transferovém médiu mezi dvěma vzduchovými bublinami. Embryolog vsunul katetr do zavaděče a dle pokynů gynekologa zavedl až k fundu dělohy. Pak jemným stiskem pístu stříkačky, na které byl nasazen katetr vytlačil embrya i s malým množstvím transferového média do dělohy pacientky. Na závěr celého procesu embryolog v laboratoři pod stereolupou ještě zkontroloval, zda je katetr opravdu prázdný a nezůstalo v něm zaváděné embryo.

#### **4.7 Statistická analýza**

Na základě výsledku PGT-A vyšetření byly vytvořeny 2 skupiny embryí: embrya geneticky normální (n=552) a embrya geneticky abnormální (n=475). Standardně 14 dní po provedení kryoembryotransferu byl proveden těhotenský test z krve každé pacientky (se stanovením hladiny E2, PRGE a hCG). Výsledek těhotenského testu byl zaznamenán a při jeho pozitivním výsledku byla pacientka zvána každých 7 dní na konzultaci k IVF specialistovi a sledována (stanovení hladiny E2, PRGE a hCG v krvi a UZ) až do stanovení klinické gravidity pomocí ultrazvuku, kdy byla potvrzena akce srdeční. Tato embrya, která dala vzniknout klinické graviditě s akcí srdeční, byla zařazena do třetí skupiny – geneticky normální embrya s prokázanou klinickou graviditou (n=119). Hodnoty z time lapse systému byly odečítány během kultivace embryí.

Spojité data z time - lapse analýzy byla interpretována jako průměr (mean)  $\pm$  SD (standard deviation, směrodatná odchylka) s respektem k distribuci dat. V opačné případě jsou data interpretována jako medián a interkvartilové rozpětí (p 25 - dolní kvartil, p 75 - horní kvartil). Dvouvýběrový t-test byl použit k testování hypotézy o shodě středních hodnot časových prodloužení buněčného cyklu. V případě zešikmených dat, kdy byla zamítnuta hypotéza o normálním rozdělení, byla použita alternativní neparametrická statistika Mann Whitney U-test. Logistická regrese byla použita pro výpočet poměru šance OR (Odds Ratio) spolu s 95 % CI (konfidenční interval). Pro testování normality dat byl použit Shapiro-Wilkův test. Bootstrap 95% konfidenční interval byl použit pro porovnání časových intervalů buněčného cyklu pro

euploidní a aneuploidní embrya. Byla zvolena standardní signifikantní hladina významnosti pro zamítnutí nulové hypotézy 0,05. Všechny testy byly oboustranné.

## 5 Výsledky

Výsledky práce ukazují, že geneticky normální embrya (euploidní) mají signifikantně kratší délku trvání druhého buněčného cyklu (cc2) ( $p=0,007$ ), signifikantně kratší čas dosažení pětibuněčného embrya (t5) ( $p=0,002$ ) a signifikantně kratší čas dosažení iniciace blastulace (tSB) ( $p<0,0001$ ) ve srovnání se skupinou geneticky abnormálních embryí (aneuploidních). Parametr s2, tzn. doba mezi rozdělením ze třibuněčného na čtyřbuněčné embryo (doba mezi druhou a třetí mitózou) nebyl u těchto dvou skupin signifikantně rozdílný, byl zde však sledován trend, konkrétně delší doba mezi rozdělením ze třibuněčného na čtyřbuněčné embryo u skupiny geneticky abnormálních embryí. (Tab.2, Obr.17, Obr. 18, Obr. 19)

**Tab. 2.** Srovnání morfokinetických parametrů u skupin PGT-A normálních a abnormálních embryí

Parametr	normální embrya n=552, mean $\pm$ SD	abnormální embrya n=475, mean $\pm$ SD	p – hodnota
cc2 / h	11,605 $\pm$ 1,321	11,856 $\pm$ 1,601	<b>p=0,007</b>
s2 / h	0,672 $\pm$ 0,714	0,841 $\pm$ 1,053	p=0,065
t5 / hpi	49,151 $\pm$ - 4,619	50,066 $\pm$ 4,931	<b>p=0,002</b>
tSB / hpi	94,051 $\pm$ 5,719	97,238 $\pm$ 6,737	<b>p&lt;0,0001</b>

Pozn.: h = hodiny, hpi = hodin po fertilizaci oocytu (hours post insemination), cc2 = délka trvání druhého buněčného cyklu, s2 = doba mezi druhou a třetí mitózou, t5 = čas dosažení pětibuněčného embrya, tSB = čas iniciace blastulace, u parametru s2 median a IQR 0.5 (0.3;0.8)

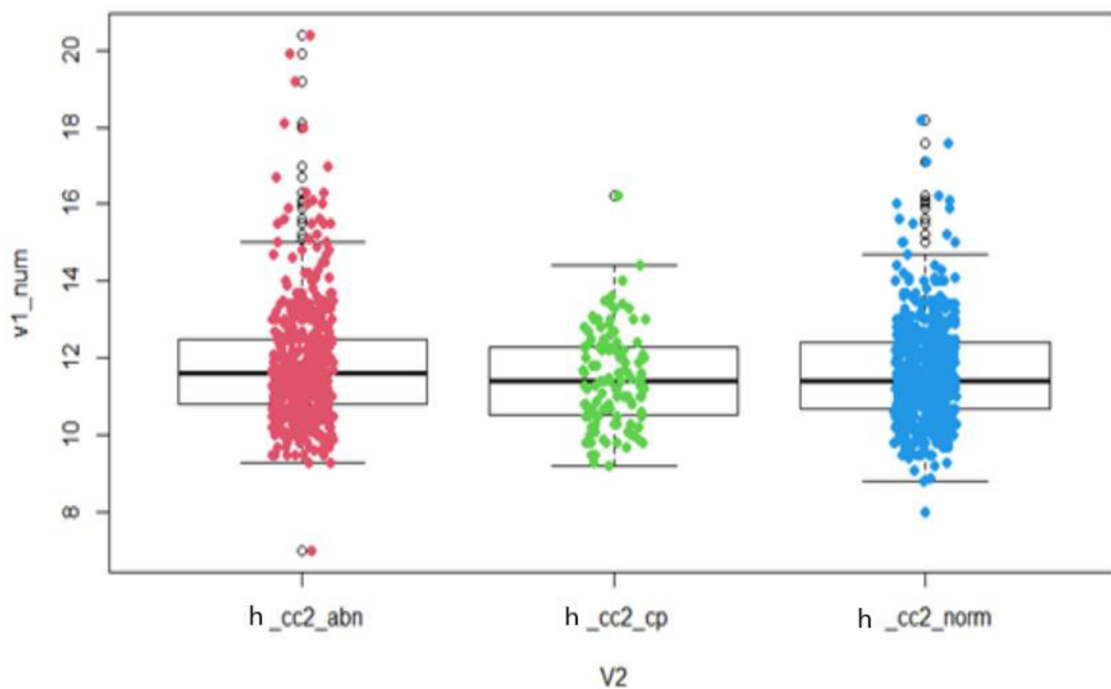
Po provedení srovnání skupin geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou a geneticky abnormálních embryí byly rovněž nalezeny signifikantně rozdílné délky trvání druhého buněčného cyklu (cc2) ( $p=0,006$ ). Konkrétně geneticky normální embrya s prokázanou klinickou graviditou mají signifikantně kratší druhý buněčný cyklus. Byl zjištěn také signifikantně kratší čas dosažení pětibuněčného embrya (t5) ( $p=0,004$ ) a signifikantně kratší čas dosažení iniciace blastulace (tSB) ( $p<0,0001$ ) u euploidních embryí s prokázanou klinickou graviditou než u aneuploidních embryí. U parametru s2 byla délka mezi rozdělením ze třibuněčného na čtyřbuněčné embryo (doba mezi druhou a třetí mitózou) u těchto dvou skupin také signifikantně rozdílná ( $p=0,021$ ) s kratším časem u normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou. (Tab. 3, Obr. 17, Obr. 18, Obr. 19)



**Tab. 3.** Srovnání morfokinetických parametrů u skupin PGT-A normálních embryí s dosaženou klinickou graviditou a abnormálních embryí

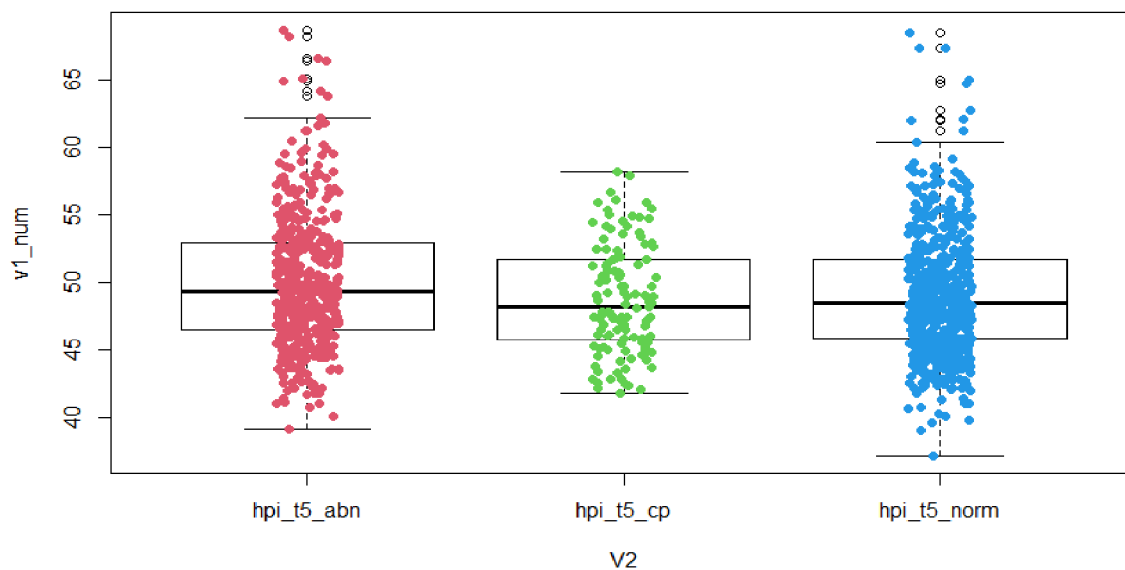
Parametr	geneticky normální embrya s ASP+ n=119, mean ± SD	geneticky abnormální embrya n=475, mean ± SD	p - hodnota
cc2 / h	11,483 ± 1,222	11,856±1,601	<b>p=0,006</b>
s2 / h	0,635 ±0,746	0,8411 ± 1,052	p=0,021*
t5 / hpi	48,800 ± 4,004	50,066 ± 4,931	<b>p=0,004</b>
tSB / hpi	93,726 ± 4,789	97,238 ± 6,737	<b>p&lt;0,0001</b>

Pozn.: h = hodiny, hpi = hodin po provedení fertilizace, (hours post insemination), cc2 = délka trvání druhého buněčného cyklu, s2 = doba mezi druhou a třetí mitózou, t5 = čas dosažení pětibuněčného embrya, tSB = čas iniciace blastulace, u parametru s2 medián a IQR 0.5 (0.3;0.8), \*Mann Whitney U-test



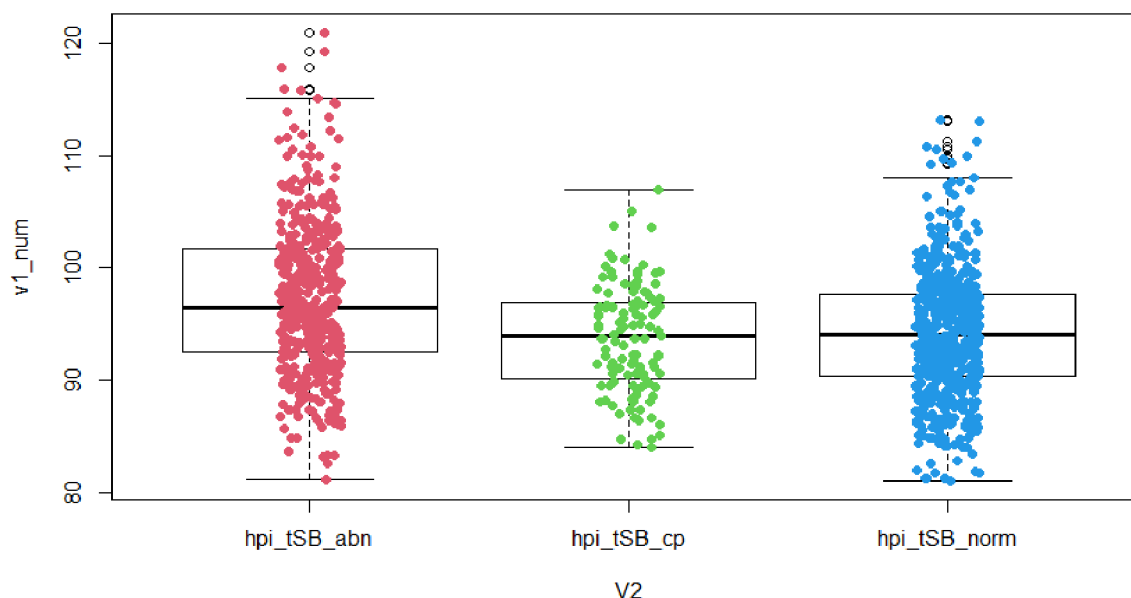
**Ob. 17.** Time-lapse rozdělení – parametr cc2 u skupin geneticky abnormálních embryí, geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou a geneticky normálních embryí

Pozn.: Boxplot je rozdělen do skupin: h\_cc2\_abn – geneticky abnormální embrya, h\_cc2\_cp – geneticky normální embrya s prokázanou klinickou graviditou, h\_cc2\_norm - geneticky normální embrya



**Obr. 18.** Time-lapse rozdělení – parametr t5 u skupin geneticky abnormálních embryí, geneticky normálních embryí a geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou

Pozn.: Boxplot je rozdělen do skupin: hpi\_t5\_abn – geneticky abnormální embrya, hpi\_t5\_cp – geneticky normální embrya s prokázanou klinickou graviditou, hpi\_t5\_norm – geneticky normální embrya



**Obr. 19.** Time-lapse rozdělení – parametr tSB u skupin geneticky abnormálních embryí, geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou a genericky normálních embryí

Pozn.: Boxplot je rozdělen do skupin: hpi\_tSB\_abn – geneticky abnormální embrya, hpi\_tSB\_cp – geneticky normální embrya s prokázanou klinickou graviditou, hpi\_tSB\_norm – geneticky normální embrya

Výsledky porovnání skupin geneticky normálních embryí a geneticky abnormálních embryí ve výskytu multinukleací ukázaly, že u skupiny geneticky normálních embryí se multinukleace ve dvoubuněčném stadiu vyskytují 2x méně často (OR=2,18; p<0,0001) než ve skupině geneticky abnormálních embryí. Ve srovnání výskytu multinukleací ve čtyřbuněčném stadiu se multinukleace ve skupině geneticky normálních embryí vyskytují 6x méně často (OR=6,27; p<0,0001) ve srovnání se skupinou geneticky abnormálních embryí (Tab.4).

U skupiny geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou se multinukleace ve stadiu dvoubuněčného embrya vyskytují 2x méně často (OR=2,013; p<0,0001) než u skupiny geneticky abnormálních embryí. Multinukleace u skupiny geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou se multinukleace ve čtyřbuněčném embryonálním stadiu vyskytují 7x méně často (OR=7,016; p<0,0001) ve srovnání se skupinou geneticky abnormálních embryí (Tab.4).

**Tab. 4.** Výskyt multinukleací ve 2buněčných a 4buněčných embryích a skupin normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou, normálních embryí a abnormálních embryí

Parametr	<b>geneticky normální embrya s CP</b>	<b>geneticky normální embrya</b>
	Odds ratio 95 % CI p-value n=119	Odds ratio 95 % CI p-value n=552
<b>NM2 geneticky abnormální embrya (n=475) vs group</b>	2,013 (1,343; 3,028)  p<0,0001	2,184 (1,7; 2,810)  p<0,0001
<b>NM4 geneticky abnormální embrya (n=475) vs group</b>	7,061 (4; 13,501)  p<0,0001	6.269 (4,609; 8,622)  p<0,0001

Pozn.: NM2 = multinukleace u dvoubuněčných embryí, MN4 = multinukleace u čtyřbuněčných embryí, CP = clinical pregnancy, klinická gravidita

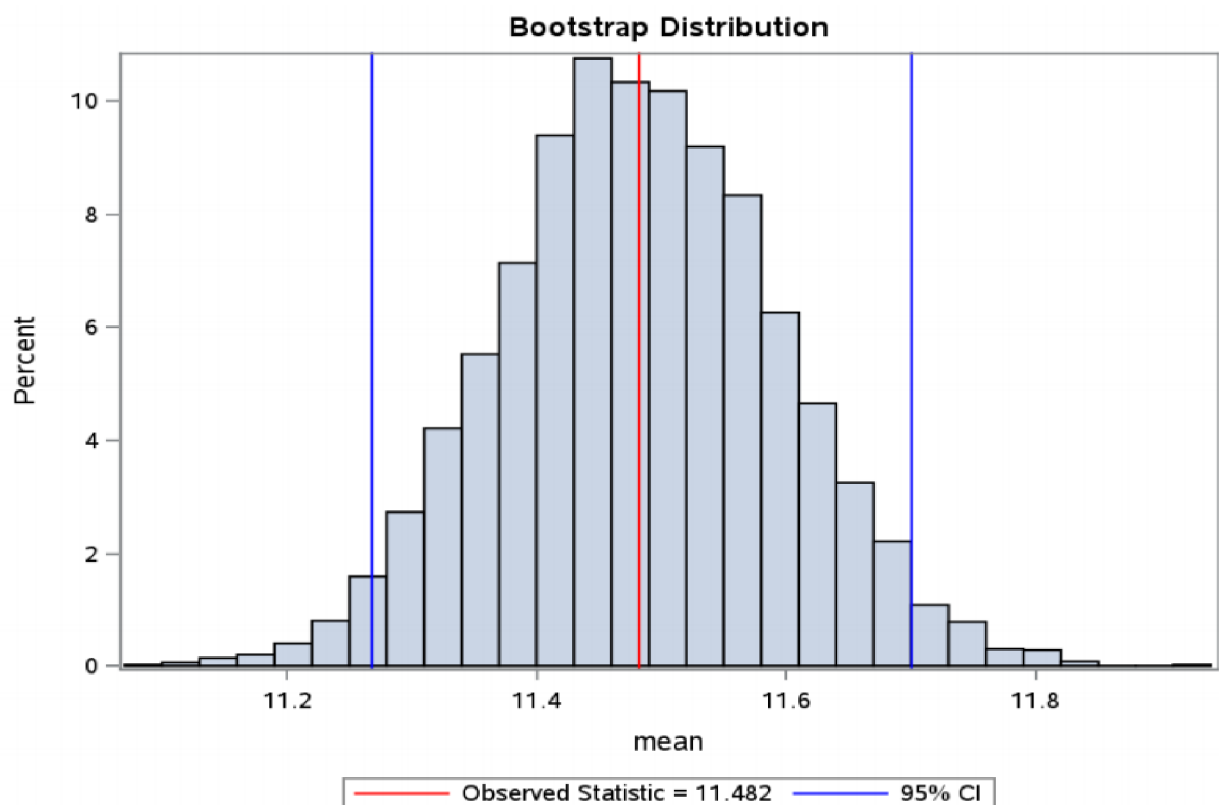
Z výsledků této práce vyplývá, že výskyt multinukleací ve fázi dvoubuněčného a čtyřbuněčného embrya významně snižuje šanci dosáhnout po embryotransferu takového embrya do dělohy pacientky klinické gravidity.

Z dat získaných v této práci a po provedení statistického zhodnocení (95 % CI, konfidenční interval) (Obr. 20, Obr. 21, Obr. 22) byly stanoveny prediktivní časové intervaly pro výběr geneticky normálního embrya s nejvyšším implantačním potenciálem (Tab. 5).

**Tab. 5.** Prediktivní časové intervaly pro morfokinetické parametry cc2, t5, tSB

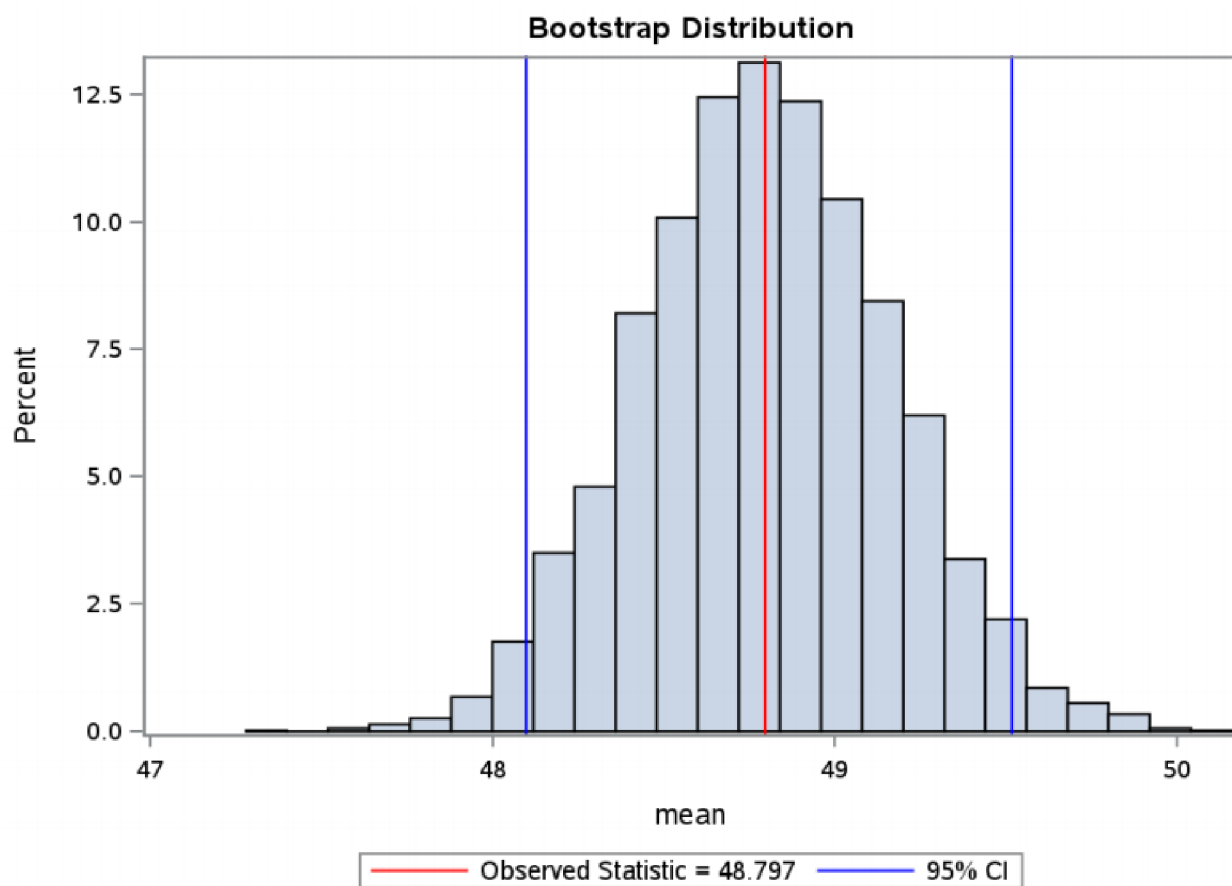
Parametr	časový interval
cc2	11,3 – 11,7 h
t5	48,1 – 49,5 hpi
tSB	92,9 – 94,6 hpi

Pozn.: h – hodin, hpi – hodin po provedení fertilizace



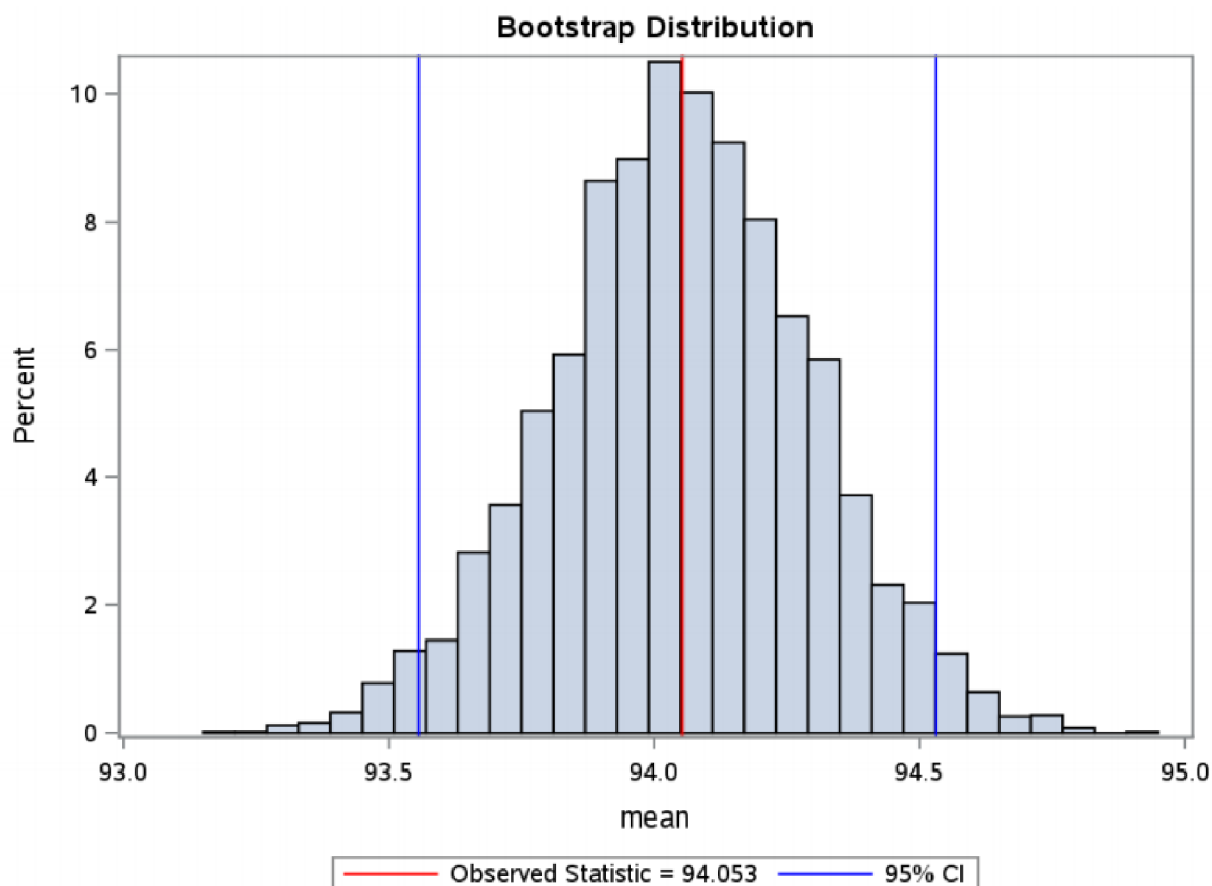
**Obr. 20.** cc2 - sloupcový graf – rozdělení podle délky trvání 2. buněčného cyklu u skupiny embryí s potvrzenou klinickou graviditou.

Pozn.: Bootstrap distribution cc2: 95% Lower CI 11.2681, 95% Upper CI 11.7004



**Obr. 21.** t5 - sloupcový graf – rozdělení podle doby dosažení 5-ti buněčného embrya u skupiny embryí s potvrzenou klinickou graviditou.

Pozn.: Bootstrap distribution t5: 95% Lower CI 48,0992; 95% CI Upper 49,5181



**Obr. 22.** tSB - sloupcový graf – rozdělení podle doby začátku blastulace u skupiny embryí s potvrzenou klinickou graviditou.

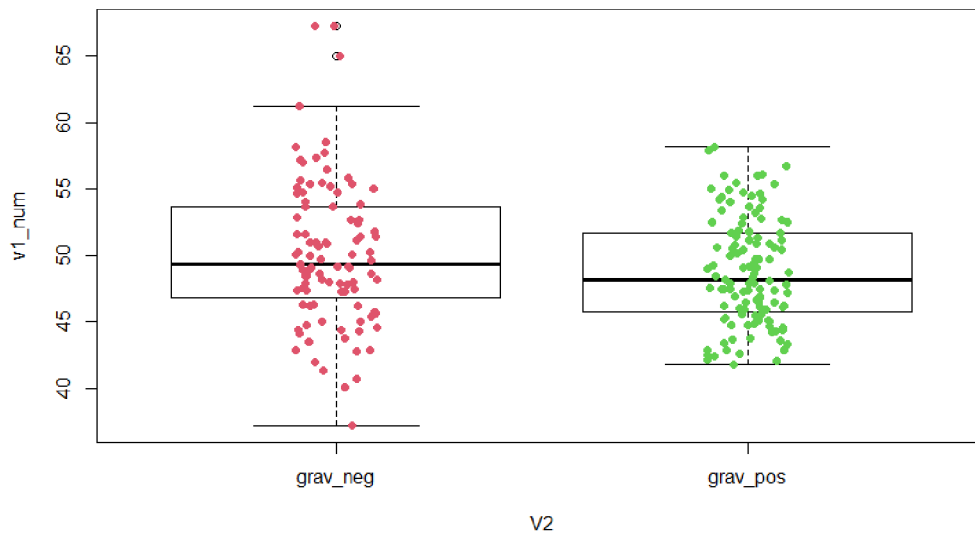
Pozn.: Bootstrap distribution tSB: 95% CI Lower 92,8790; 95% Upper CI 94,5798

Další statistickou analýzou byly zjištěny významné rozdíly v morfokinetických parametrech t5 a tSB ve skupině euploidních embryí vedoucích ke klinickému těhotenství a ve skupině euploidních embryí, která nebyla po ET implantována (Tab. 6, Obr. 23, Obr. 24). Na základě těchto výsledků bylo doporučeno, že parametry t5 a tSB by měly být použity jako základní parametry při výběru embryí. Ve druhé fázi výběru embrya je vhodné použít morfokinetický parametr cc2 a výskyt MN během prvních dvou buněčných dělení. Na základě navrhovaného použití těchto morfokinetických parametrů a výskytu MN lze vybrat nejlepší euploidní embryo pro ET s vysokou pravděpodobností.

**Tab. 6.** Srovnání morfokinetických parametrů t5 a tSB u skupin PGT-A normálních embryí s dosaženou klinickou graviditou (ASP+) a PGT-A normálních embryí s negativním těhotenským testem

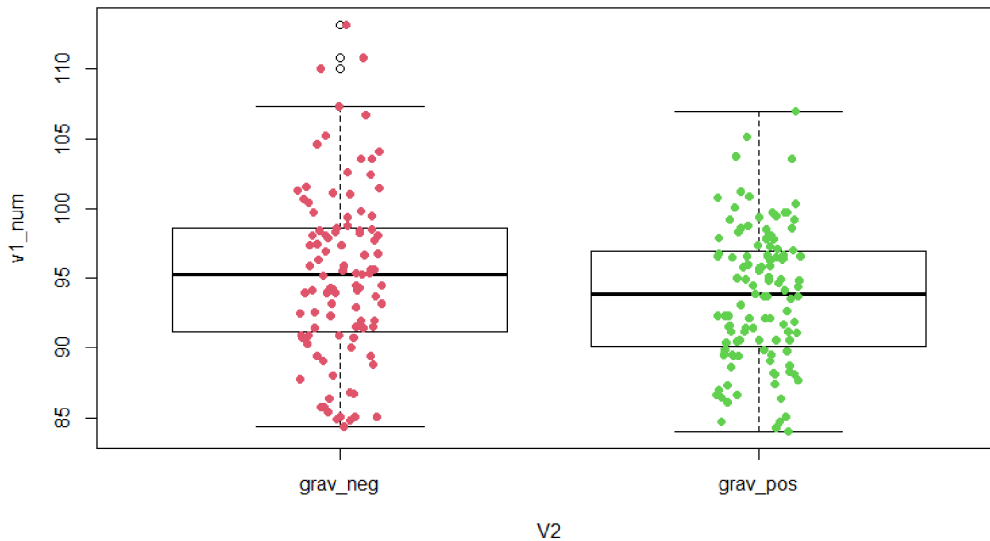
Parametr	geneticky normální embrya s ASP+ n=119, mean ± SD	geneticky normální embrya – negativní těhotenský test n=99, mean ± SD	p - hodnota
t5 / h	48,800 ± 4,004	50,148 ± 5,443	<b>p=0,043</b>
tSB / h	93,726 ± 4,789	95,287 ± 6,139	<b>p=0,041</b>

Pozn.: h – hodin



**Obr. 23.** Time-lapse rozdělení – parametr t5 u skupin geneticky normálních embryí s negativním těhotenským testem a geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou

Pozn.: Boxplot je rozdělen do skupin: grav\_neg – geneticky normální embrya s prokázaným negativním těhotenským testem po KET, grav\_pos – geneticky normální embrya s prokázanou klinickou graviditou



**Obr. 24.** Time-lapse rozdělení – parametr tSB u skupin geneticky normálních embryí s negativním těhotenským testem a geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou

Pozn.: Boxplot je rozdělen do skupin: grav\_neg – geneticky normální embrya s prokázaným negativním těhotenským testem po KET, grav\_pos – geneticky normální embrya s prokázanou klinickou graviditou

Na základě získaných výsledků byl sestaven jednoduchý hierarchický model, který byl doporučen používat jako nástroj k selekci time-lapse kultivovaných embryí k ET. Parametry t5 a tSB a jejich doporučené časové intervaly by měly být použity jako základní parametry při výběru kvalitních embryí. Ve druhé fázi výběru kvalitního embrya je na základě modelu doporučeno použít morfokinetický parametr cc2 a výskyt multinukleací v blastomerách během prvních dvoubuněčných dělení, zejména ve čtyřbuněčném stadiu vývoje embrya.



## 6 Diskuze

V této práci byla preimplantační lidská embrya párů, které podstoupily IVF léčbu na Klinice reprodukční medicíny a gynekologie Zlín, zhodnocena pomocí metody preimplantačního genetického testování aneuploidií (PGT-A) a zároveň metodou time-lapse kontinuálního monitoringu. V průběhu kultivace embryí v time-lapse systému EmbryoScope byly sledovány a zaznamenány konkrétní morfokinetické parametry a morfologické znaky všech kultivovaných embryí. Po vyšetření embryí (buněk trofektodermu embryí) metodou PGT-A byly ve skupině geneticky abnormálních embryí a geneticky normálních embryí zjištěny signifikantně rozdílné hodnoty u některých sledovaných morfokinetických parametrů (cc2, t5, tSB) a morfologických znaků (výskyt multinukleací u dvoubuněčných embryí a čtyřbuněčných embryí). Podobné výsledky byly zjištěny u skupiny geneticky abnormálních embryí výsledky ve skupině geneticky normálních embryí, která vedla ke klinické graviditě. Zároveň byly porovnány morfokinetické parametry a morfologické znaky u skupin geneticky normálních embryí, které po embryotransferu vedla ke klinické graviditě (implantovaná embrya) a geneticky normálních embryí, po jejichž zavedení pacientka neotěhotněla (neimplantovaná embrya). Byl zjištěn signifikantně významný rozdíl u morfokinetických parametrů t5 a tSB.

Hlavním důvodem implantačního selhání a abortů v IVF léčebných cyklech bývá vysoký výskyt aneuploidií v lidských oocytech a embryích, tyto aneuploidie postihují více než 50 % embryí a jejich výskyt úměrně roste s narůstajícím věkem matky (Fragouli *et al.*, 2014). Embrya k embryotransferu bývají stále velmi často selektována jen na základě své morfologie. Ukazuje se však, že i aneuploidní embrya jsou schopna dosáhnout vysokého morfologického skóre, tzn. na základě konvenčního morfologického hodnocení je nelze rozlišit od embryí euploidních (Alfarawati *et al.*, 2011).

Embryotransfer kvalitní euploidní blastocysty velmi silně koreluje s optimálními výsledky IVF léčby, tedy s vysokou pregnancy rate (Irani *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018; Nazem *et al.*, 2019; Murugappan *et al.*, 2020; Lou *et al.*, 2021;), kromě toho morfokinetické parametry jsou asociovány s morfologickou kvalitou blastocyst.

V současnosti se stále více rozvíjí hodnocení embryí pomocí time-lapse monitoringu. Poměrně hodně studií se zaměřilo na problematiku určení prognostických faktorů získaných

z kultivace v time-lapse systému k označení euploidního embrya, ale jejich výsledky byly zatím rozdílné (Kaser & Racowsky, 2014).

Ve své studii Davis *et al.* (2012) zjistili opoždění prvního a druhého buněčného dělení a prodloužení doby mezi dvoubuněčným a čtyřbuněčným stadiem u aneuploidních embryí. Podobné závěry, že geneticky normální a geneticky abnormální embrya mají rozdílné morfologické parametry, učinila ve své studii i Basile *et al.* (2014). Chavez *et al.* (2012) ve své studii zjistili, že euploidní embrya mají kratší a časově přesnější parametry až do čtyřbuněčného stadia.

Pro studii byly zvoleny morfokinetické parametry cc2, s2, t5, tSB, výskyt multinukleací ve dvoubuněčném stadiu (MN2) a čtyřbuněčném stadiu (MN4). Námi zvolené morfokinetické parametry a morfologické znaky byly hodnoceny i v těchto studiích: t5 (Basile *et al.*, 2014) t5, cc2 (Meseguer *et al.*, 2011) s2 (Meseguer *et al.*, 2011; Minasi *et al.*, 2016) cc2, s2 (Chavez *et al.*, 2012; Minasi *et al.*, 2016) tSB (Campbell *et al.*, 2013; Minasi *et al.*, 2016; Mumusoglu, *et al.*, 2017) a ve všech zmíněných studiích byly signifikantně kratší morfokinetické parametry u geneticky normálních embryí ve srovnání s embryi geneticky abnormálními.

Vědci ve studii v čele s Del Carmen Nogales (2017) zjistili, že morfokinetické parametry mohou záviset na typu chromozomální abnormality, tzn. embrya s velkou mírou chromozomálních abnormalit se chovají jinak než embrya geneticky normální. Naopak embrya s trizomií se překvapivě chovají velmi podobně jako geneticky normální embrya.

Některé studie se zaměřily na hodnocení morfokinetických parametrů u embryí s různou mírou mozaicismu, protože se zvyšující se přesností PGT-A (NGS, hrNGS) se zvyšuje i počet detekovaných embryí s výskytem mozaicismu. Při porovnávání skupin geneticky normálních embryí a embryí nízkou mírou mozaicismu, nebyly nalezeny žádné významné rozdíly v morfokinetických parametrech. Ve skupině embryí s vysokou mírou zastoupení mozaicismu byly některé morfokinetické parametry opožděné (např. t5, t8, cc3) a byl zjištěn vyšší výskyt multinukleací (Lee *et al.*, 2019). Jiná studie ukazuje, že morfokinetické parametry mozaicistních embryí v podstatě odpovídají překrývajícím se hodnotám načasování buněčného dělení skupiny euploidních a aneuploidních embryí (Martín *et al.*, 2021).

V této práci byl zjištěn signifikantně významný rozdíl v morfokinetických parametrech (t5, tSB) u skupiny geneticky normálních implantovaných embryí (po ET pozitivní těhotenský

test a prokázaná ASP) a geneticky normálních embryí bez implantace (negativní těhotenský test). Jiné studie naopak přišly se zjištěním, že se parametry u implantovaných embryí a neimplantovaných embryí (Chamayou *et al.*, 2013; Kirkegaard *et al.*, 2013a) a geneticky normálních a geneticky abnormálních embryí vůbec nelišily (Rienzi *et al.*, 2015).

Některé studie zjistily, že morfokinetické parametry mohou být ovlivněny i jinými faktory než těmi genetickými, a to například kvalitou kultivačních médií (Ciray *et al.*, 2012), které každé IVF centrum používá dle své vlastní volby a zkušeností. V evropské unii je možné používat jen kritický materiál (mezi něj patří jak média, tak veškerý materiál, který přijde do kontaktu se zárodečnými buňkami a embryi), který splňuje evropskou Směrnicí o zdravotnických prostředcích 92/43 EEC. IVF centra se mezi sebou lišila i v použití různých stimulačních protokolů (Munoz *et al.*, 2013) nebo do svých studií autoři zahrnovali embrya, u kterých byla fertilizace provedena různými metodami (IVF/ICSI) a to i v rámci jedné studie (Dal Canto *et al.*, 2012). Velmi silné rozdíly u morfokinetických parametrů může vyvolat i rozdílná koncentrace kyslíku v kultivačním prostředí, která může být normální (21 %) nebo redukováná (5 %) (Kirkegaard *et al.*, 2013b). Do studií bývají zahrnuty silně obézní pacientky (Bellver *et al.*, 2013) nebo pacientky, které jsou silné kuřačky (Fréour *et al.*, 2013), což pak zkresluje konečné výsledky.

Ze zjištěných časových údajů u sledovaných morfokinetických parametrů u skupiny geneticky normálních embryí, která vedla ke vzniku klinické gravidity, byly stanoveny konkrétní časové intervaly, které by měly predikovat embrya s vysokým implantačním potenciálem. Pro morfokinetický parametr cc2 (délka trvání druhého buněčného cyklu) je to 11,27 h až 11,70 h; pro parametr t5 (čas od fertilizace oocytu až po rozdělení na 5ti buněčné embryo) byl stanoven časový interval od 48,10 hpi až do 49,52 hpi a pro parametr tSB by měl být nejideálnější čas počátku blastulace, počítáno opět od okamžiku fertilizace oocytu, v intervalu 92,88 hpi až 94,58 hpi.

Podobné časové intervaly u těchto parametrů byly publikovány pro embrya s potenciálem dosáhnout stádia blastocysty, kdy cc2 bylo stanoveno na 7,8 – 14,3 hodin (Wong *et al.*, 2010), přičemž tento interval je o dost delší než stanovený v této práci, tím pádem lze předpokládat, že parametr stanovený v této práci by měl být přesnější. Meseguer *et al.* (2011) stanovili pro tentýž parametr cc2, že by měl být roven či kratší než 11,9 h, což je velmi blízké horní hranici intervalu stanoveného v této práci. Cruz *et al.* (2012) určili pro

morfokinetický parametr t5 časový interval 48,8 hpi až 56,6 hpi, který je opět širší než určený v této práci. Campbell *et al.* (2013) zjistili pro embrya s nízkým rizikem aneuploidií interval u parametru tSB (start blastulace) maximálně do 96,2 hpi.

Souvislost mezi morfokinetickými parametry a ploidií embrya dosud nebyla zcela jasně pochopena. Několik studií naznačuje, že morfokinetické parametry mohou předpovědět stav chromozomálního statusu embrya (Campbell *et al.*, 2014; Minasi *et al.*, 2016; Pennetta *et al.*, 2021).

Několik studií však uvedlo, že pomocí morfokinetických parametrů nelze předvídat euploidie (Zhang *et al.*, 2017) nebo že mají nízkou až střední schopnost předvídat euploidie embryí (Mumusoglu *et al.*, 2017). Dva publikované systematické přehledy kromě toho ukázaly, že je time-lapse monitoring je sice slibný nástroj s velkým potenciálem pro objektivní posouzení embryonálního vývoje, ale morfokinetické parametry by se zatím neměly používat jako náhrada za PGT k určení ploidiie embryí (Zaninovic *et al.*, 2017; Reignier *et al.*, 2018).

Multinukleace přítomné v blastomerách časného embrya jsou běžná embryonální abnormalita (Hardy *et al.*, 1993). U 50 % - 100 % geneticky vyšetřených embryí s výskytem multinukleací se vyskytovaly aneuploidie nebo mozaicismus (Munné *et al.*, 2006). Je ale velmi pravděpodobné, že embrya na základě vlastního opravného mechanismu (self-correction mechanism) jsou schopna blastomery s multinukleacemi opravit a po mitotickém dělení vzniknou dvě dceřiné euploidní blastomery s jedním jádrem. Je zřejmé, že většina embryí s multinukleacemi v blastomerách jsou aneuploidní nebo mozaicistní, nicméně díky „self-correction“ mechanismu mohou některá embrya nakonec být euploidní (Yilmaz *et al.*, 2014). Nicméně je zřejmé, že výskyt multinukleací ve stadiu dvoubuněčného embrya snižuje míru implantace embrya po embryotransferu i počet dosažených klinických gravidit (Ergin *et al.*, 2014) a také zvyšuje počet detekovaných aneuploidií (Ambroggio *et al.*, 2011). Je zajímavé, že vyšší míra multinukleací u blastomer byla zaznamenána ve dvoubuněčném stadiu a s přechodem embrya do čtyřbuněčného stadia se výskyt multinukleací výrazně snížil (Balakier *et al.*, 2016) pravděpodobně díky „self-correction“ mechanismu. Podobné výsledky, konkrétně vyšší výskyt multinukleací u dvoubuněčných embryí než u čtyřbuněčných embryí, byly zaznamenány také v této práci. Z této práce dále vyplývá i to, že významnější pro predikci výskytu aneuploidií u embryí je výskyt multinukleací v blastomerách ve stadiu čtyřbuněčného embrya.

Některé morfokinetické parametry a morfologické znaky mohou zcela jistě souviset s genetickou výbavou embrya a mohly by být používány pro výběr nejlepšího embrya. Zcela jistě zatím time-lapse monitoring nemůže nahradit preimplantační genetické vyšetření embryí, ale může pomoci k výběru toho nejperspektivnějšího embrya zejména u pacientů, kteří nejsou lékařem-genetikem indikováni pro PGT-A, tzn. vyšetření jim není hrazeno ze zdravotního pojištění. V režimu samoplátce je pak PGT-A finančně velmi náročné, a to se musí vzít v úvahu navíc také to, že pacienti už musejí dopláct na samotný IVF cyklus, jehož součástí může být PGT-A, protože ten pojišťovna hradí jen částečně. Pojištěnci českých zdravotních pojišťoven mohou absolvovat s doplatkem od pojišťovny tři IVF cykly, pokud si v prvních dvou cyklech nechají zavést jen 1 embryo, tak pojišťovna přispívá na čtyři IVF léčebné cykly. Klinický genetik může indikovat PGT při opakovaném selhání léčby IVF, opakovaném potracení, u pacientek starších 35 let, u páru, kde je u muže diagnostikována oligozoospermie, silná astenozoospermie, teratozoospermie nebo kombinace výše uvedených nálezů. Do této skupiny spadá i diagnóza azoospermie, kdy jsou spermie získávány obvykle technikou MESA/TESE. U párů, kde je diagnostikována genetická vada, genetik také indikuje preimplantační vyšetření embryí, s tím, že se nejdříve vyšetří sledovaná genetická abnormalita a u embryí, které nejsou nositeli abnormálního genu / translokace se v druhém kole provede ještě vyšetření výskytu aneuploidí.

Je pravda, že rozvoj technologií spjatých s time-lapse proběhl velmi rychle a že zavedení do klinické praxe nebylo podpořeno rozsáhlejšími klinickými studiemi, které by se zaměřily na posouzení naprosté bezpečnosti a efektivity této nové metody. Nicméně time-lapse monitoring je klinicky využíván již 10 let a poslední vědecké práce, výsledky kultivace embryí a pregnancy rate jasně dokazuje, že tato metoda je zcela bezpečná a přispívá k lepším výsledkům léčby neplodnosti i tím, že poskytuje lepší kultivační podmínky ve srovnání s kultivací v běžném kultivačním boxu (Kovacs, 2014; Casteló *et al.*, 2016). Velmi často se objevují polemiky ohledně finančních nákladů na laboratorní vybavení nutné k provádění time-lapse kultivace a nákladů vynaložených na zaškolení embryologů, kteří se musí naučit celý systém ovládat, a navíc správně odečítat potřebná data a ta interpretovat.

Časová náročnost vyhodnocování vývoje embryí je v současnosti možné obejít použitím time-lapse systémů s umělou inteligencí, která na základě svých „zkušeností“ vybere to nejlepší embryo sama a obejde tím poměrně vysokou míru subjektivity spojenou s výběrem

nejlepšího embrya k ET embryologem. Nicméně zcela automatizované hodnocení embryí je náročné kvůli složitosti morfologie embryí. Napodobování dovedností vysoce vyškolených embryologů v efektivním hodnocení embryí v plně automatizovaném systému je hlavní výzvou v oblasti počítačově podporovaného hodnocení embryí ve všech již provedených studiích, ale i v těch budoucích. Největší úskalí se jeví zejména kvůli zaměření na měření specifických expertně definovaných parametrů, jako je například tloušťka *zona pellucida*, počet blastomer, stupeň buněčné symetrie, cytoplazmatické fragmentace atd. (Rocha *et al.*, 2017a; Rocha *et al.*, 2017b). Strojové učení (machine learning) je volně definováno jako počítačový program, který se v průběhu času prostřednictvím zkušeností učí daný úkol a zdokonaluje se, aby dosáhl co nejlepšího výkonu úkolu. V posledním desetiletí pokroky v oblasti hardwarového výpočetního výkonu a technik strojového učení výrazně zlepšily jejich použitelnost v reálných lékařských i nelékařských problémech. Nedávno bylo jako řešení pro automatizovanou analýzu morfologií embryí navrženo strojové učení (Rocha *et al.*, 2017b; Dimitriadis *et al.*, 2019; Bormann *et al.*, 2020). Tyto studie popisují využití konvoluční neuronové sítě (convolutional neural network, CNN), prezentují techniku učení, která se ukázala jako účinná v úlohách klasifikace snímků z time-lapse. Na rozdíl od většiny dřívějších počítačově podporovaných algoritmů, včetně některých technik strojového učení používaných pro hodnocení embryí, uvedená architektura CNN umožňuje automatizovaný výběr a analýzu vlastností embrya na úrovni pixelů bez jakéhokoli zásahu embryologa (Rocha *et al.*, 2017a; Rocha *et al.*, 2017b). Takové sítě nezávisí na vlastnostech specifikovaných člověkem a mohou vyvinout schopnost kategoricky hodnotit embrya prostřednictvím interaktivního učení z tisíců předchozích případů. Zde je důležité zdůraznit, že většina IVF center zatím nemá časosběrný zobrazovací hardware, jak v Evropě, tak ani ve Spojených státech amerických (Dolinko *et al.*, 2017). Nedostatečná dostupnost takového hardwaru omezuje jinak slibnou technologii většinou na prostředí bohatá a ekonomicky vyspělá a nezlepšuje kvalitu péče a přístup k ní v prostředí s omezenými zdroji, kde jsou takové pokroky naléhavě potřeba (Wahl *et al.*, 2018; Hosny & Aerts, 2019). Jen náklady spojené s pořízením time-lapse kultivačního systému se v České republice pohybují kolem 4 miliónů korun, což si malá IVF centra v dnešní době většinou nemohou dovolit.

Vysoká pořizovací cena time lapse systému se pak samozřejmě promítne v konečné ceně za metodu pro pacienty, která je v současnosti v samoplátcovském režimu bez příspěví

pojišťovny. Nicméně stále je time-lapse cenově dostupnější než provedení PGT bez indikace, tzn. bez nároku na proplacení pojišťovnou. Pro tyto pacienty pak může být time-lapse alternativou k výběru toho nejlepšího embrya k ET, zejména pro ty pacienti, kteří nechtějí či nemohou absolvovat PGT z jakýchkoli jiných důvodů, například právních, sociálních, náboženských nebo ekonomických.

Konkrétní morfokinetické parametry a morfologické znaky, které signifikantně predikují kvalitu embrya, mohou podstatně zjednodušit a urychlit pracovní postupy v embryologické laboratoři při výběru embryí k embryotransferu a ke kryokonzervaci. Mohou také přispět k zefektivnění a urychlení léčby neplodnosti ve smyslu, že pacientka po použití time-lapse monitoringu (nebo PGT) otěhotní hned po prvním embryotransferu, protože vybrané embryo má opravdu nejvyšší implantační potenciál z celé aktuální kohorty jejích embryí. Snižují se tak výrazně náklady jak pacientům, kteří nemusí absolvovat více embryotransferů k dosažení klinické gravidity a následně porodu zdravého dítěte, tak zdravotnímu systému zejména díky single embryotransferu nejlepšího embrya a následně péči o pacientky s jednočetnými graviditami.

## 7 Závěr

Tato dizertační práce byla zaměřena na sledování hodnot morfokinetických parametrů cc2, s2, t5 a tSB a výskytu multinukleací v blastomerách dvoubuněčných a čtyřbuněčných embryí kultivovaných v time-lapse systému. Tato embrya byly vyšetřena metodou PGT-A a rozdělena do dvou skupin: geneticky normální embrya a geneticky abnormální embrya. Zjištěné hodnoty morfokinetických parametrů a výskytu multinukleací byly statisticky porovnány u skupiny geneticky normálních a geneticky abnormálních embryí, u skupiny geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou a geneticky abnormálních embryí a u skupiny geneticky normálních embryí s prokázanou klinickou graviditou a geneticky normálních embryí s prokázaným negativním testem po KET. Cílem bylo nalézt souvislost mezi těmito morfokinetickými parametry a znaky a genetickou kvalitou embryí, které by pak mohly sloužit k selekci kvalitních embryí bez použití invazivní PGT metody.

Na základě provedené klinické studie v embryologické laboratoři Kliniky reprodukční medicíny a gynekologie byly zjištěny významné rozdíly v morfologických parametrech cc2, t5 a tSB a výskyt multinukleací ve stadiu dvoubuněčných a čtyřbuněčných embryí mezi skupinou geneticky normálních embryí a abnormálních embryí, také mezi skupinou geneticky normálních embryí, která vedla ke klinickému těhotenství po ET a skupinou abnormálních embryí. Z morfokinetických dat zjištěných ve skupině geneticky normálních embryí vedoucích ke klinickému těhotenství byly stanoveny na základě statistické analýzy časové intervaly, které by měly predikovat embrya s vysokým implantačním potenciálem: cc2: 11,3–11,7 hpi, t5: 48,1–49,5 hpi, tSB: 92,9–94,6 hpi.

Výskyt multinukleací v blastomerách ve skupině geneticky normálních embryí, která vedla ke klinickému těhotenství, byl ve stádiu dvoubuněčného embrya 2x nižší a ve stádiu čtyřbuněčného embrya 7x nižší než ve skupině geneticky abnormálních embryí.

Na závěr byly zjištěny významné rozdíly v morfokinetických parametrech t5 a tSB ve skupině geneticky normálních embryí vedoucích ke klinickému těhotenství a ve skupině geneticky normálních embryí, která po KET nebyla implantována.

Na základě těchto výsledků se podařilo sestavit jednoduchý hierarchický model k selekci time-lapse kultivovaných embryí k ET. Parametry t5 a tSB a jejich doporučené časové intervaly by měly být použity jako základní parametry při výběru kvalitních embryí. Ve druhé



fázi výběru kvalitního embrya je doporučeno použít morfokinetický parametr cc2 a výskyt multinukleací v blastomerách během prvních dvou buněčných dělení, zejména ve čtyřbuněčném stadiu vývoje embrya.

Po zavedení používání uvedeného selekčního hierarchického modelu a zejména při použití navržených morfokinetických parametrů, jejich doporučených časových intervalů a výskytu multinukleací v blastomerách do klinické praxe bude možné s vysokou pravděpodobností vybrat nejlepší euploidní embryo pro embryotransfer i bez invazivního PGT vyšetření.

## 8 Seznam použité literatury

- Adler, A., Lee, H.L., McCulloh, D.H., Ampeloquio, E., Clarke-Williams, M., Wertz, B.H., Grifo, J., 2014. Blastocyst culture selects for aneuploid embryos: comparison of blastomere and trophoctoderm biopsies. *Reprod Biomed Online*, 28, 485-491.
- Agarwal, A., Cho, C.L., Majzoub, A., Esteves, S.C., 2017. The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Transl Androl Urol*, 6, 720–733.
- Aksglaede, L., Juul, A., 2013. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*, 168, R67-76.
- Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Stevens, J., Gutiérrez-Mateo, C., Shoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., Wells, D., 2011. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*, 95, 520–524.
- Ambroggio, J., Gindoff, P.R., Dayal, M.D., Khaldi, R., Peak, D., Frankfurter, D., Dubey, A.K., 2011. Multinucleation of sibling blastomere on day 2 suggest unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertil Steril*, 96, 856–859.
- Aoyama, N, Kato, K., 2020. Trophoctoderm biopsy for preimplantation genetic test and technical tips: A review. *Reprod Med Biol*, 19, 222-231.
- Asero, P., La Vignera, S., Lanzafame, F., 2010. Genetic aspects in male infertility. *J Androl Sciencis*, 17, 1-16.
- Azenabor, A., Ekun, A.O., Akinloye, O., 2015. Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. *J Reprod Infertil*, 16, 123-129.
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosovsky, A., Yagoda, A., Lederman, H., Artzi, S., Gross, M., Barak, Y., 2003. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*, 80, 1413-1419.
- Balakier, H., Sojecki, A., Gelareh, M., Librach, C., 2016. Impact of multinucleated blastomeres of embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy. *Fertil Steril*, 106, 608–614.
- Basile, N., Del Carmen Nogales, C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, M., García-Velasco, J., Meseguer, M., 2014. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril*, 101, 699-704.

Basile, N., Vime, P., Florensa, M., Aparicio Ruiz, B., García Velasco, J. A., Remohí, J., Meseguer, M., 2015. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*, 30, 276–283.

Beckmann, C.R.B. *Obstetrics and gynecology*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, c2014. ISBN 978-1-4511-4431-4.

Bellver, J., Mifsud, A., Grau, N., Privitera, L., Meseguer, M., 2013. Similar morphokinetic patterns in embryo derived from obese and normoweight infertile woman: A time-lapse study. *Hum Reprod*, 28, 794–800.

Beránek, M., 2016. Molekulární genetika pro bioanalytiku. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7.

Bhattacharya, S., 2018. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. In *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*; Infotechopen: London, UK.

Bormann, C.L., Thirumalaraju, P., Kanakasabapathy, M.K., Kandula, H., Souter, I., Dimitriadis, I., Gupta, R., Pooniwala, R., Shafiee, H., 2020. Consistency and objectivity of automated embryo assessments using deep neural networks. *Fertil Steril*, 113, 781–787.

Botros, L., Sakkas, D., Seli, E., 2008. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod*, 14, 679-90.

Bozhedomov, V.A., Lipatova, N.A., Rokhlikov, I.M., Alexeev, R.A., Ushakova, I.V., Sukhikh, G.T., 2014. Male infertility and varicocele: role of immune factors. *Andrology*, 2, 51-58.

Brennan, M.L., Schrijver, I., 2016. Cystic fibrosis: a review of associated phenotypes, use of molecular diagnostic approaches, genetic characteristic, progress, and dilemmas. *J Mol Diagn*, 18, 3-14.

Brezina, P.R., Anchan, R., Kearns, W.G., 2016. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet*, 33, 823-832.

Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Hickman, C.F., 2013. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod BioMed Online*, 26, 477–485.

Campbell, A., Fishel, S., Laegdsmand, M., 2014. Aneuploidy is a key causal factor of delays in blastulation: author response to 'A cautionary note against aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging'. *Reprod BioMed Online*, 28, 279-283.

- Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiully, R., Elliot, T., Wright, G., Nagy, Z.P., Ubaldi, F.M., 2014. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod*, 29, 1173–1181.
- Cariati, F., D'Argenio, V., Tomaiuolo, R., 2019. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med* 17, 267.
- Castellani, C., Picci, L., Tamanini, A., Girardi, P., Rizzoti, P., Assael, B.M., 2009. Association between carrier screening and incidence of cystic fibrosis. *J Am Med Assoc*, 302, 2573-2579.
- Castelló, D., Motato, Y., Basile, N., Remohí, J., Espejo-Catena, M., Meseguer, M., 2016. How much have we learned from time – lapse in clinical IVF? *Mol Hum Reprod*, 22, 719-727.
- Cibula, D., Živný, J., 2000. Syndrom předčasného ovariálního selhání. *Čes Gynkol*, 65, 98-102.
- Ciray, H.N., Aksoy, T., Goktas, C., Ozturk, B., Bahceci, M., 2012. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—A sibling oocyte study. *J. Assist Reprod Genet*, 29, 891–900.
- Coates, A., Kung, A., Mounts, E., Hesla, J., Bankowski, B., Barbieri, E., Ata, B., Cohen, J., Munné, S., 2017. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*, 107, 123–130.
- Coward, K., Wells, D., 2013. Textbook of clinical embryology. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-16640-9.
- Crha, I., 2010. Farmakoterapie v reprodukční medicíně. *Prakt lékáren*, 6, 173–176.
- Crha, I., 2018. Fyziologie reprodukce ženy. Řezáčová, J., Crha, I., Darebný, P., Fait, T., Hanáček, J., Janský, M., Konečná, H., Koubková, B., Madar, J., Malíčková, K., Mardešić T., Raušová, E., Rutarová, J., Řezáč, J., Řežábek, K., Sobek, A., Ščamburová, J., Šnajderová, M., Trávník, P., Ulčová-Gallová, Z. Reprodukční medicína. Současné možnosti v asistované reprodukci. Praha: Mladá fronta, s.16. ISBN 978-80-204-4657-2.
- Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Perez-Cano, I., Munoz, M., Meseguer, M., 2012. Timing of cell division in human cleavage-stage embryo is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod BioMed Online*, 25, 371–381.
- Čepický, P. 1999. Psychosomatické aspekty gynekologie a porodnictví. *Moderní Gynkol Por*, 8, 163-250.

Dal Canto, M., Coticchio, G., Mignini Renzini, M., De Ponti, E., Novara, P.V., Brambillasca, F., et al., 2012. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online*, 25, 474–80.

Davis, S., Christopikou, D., Tsorva, E., Karagianni, A., Handyside, A.H., Matrominas, M., 2012. Delayed cleavage division and prolonged transition between 2- and 4cell stages in embryos identified as aneuploidy at the 8-cell stage by array-CGH. *Hum Reprod*, 27, 84–86.

Del Carmen Nogales, M., Bronet, F., Basile, N., Martinez, E.M., Linan, A., Rodrigo, L., Meseguer, M., 2017. Type of chromosome abnormality affect embryo morphology dynamics. *Fertil Steril*, 107, 229-235e2.

Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L.R., Austin, C., Goldberg, J., Falcone, T., 2014. Analysis of embryo morphokinetic, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 54.

Dimitriadis, I., Bormann, C.L., Thirumalaraju, P., Kanakasabapathy, M., Gupta, R., Pooniwala, R., Souter, I., Hsu, J.Y., Rice, S.T., Bhowmick, P., Shafiee, H., 2019. Artificial intelligence-enabled system for embryo classification and selection based on image analysis. *Fertil Steril*, 111, e21.

Dirican, E.K., Ozgün, O.D., Akarsu, S., Akin, K.O., Ercan, O., Uğurlu, M., Camsari, C., Kanyilmaz, O., Kaya, A., Unsal, A., 2008. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet*, 25, 375-81.

Dolinko, A.V., Farland, L.V., Kaser, D.J., Missmer, S.A., Racowsky, C., 2017. National survey on use of time-lapse imaging systems in IVF laboratories. *J Assist Reprod Genet*, 34, 1167–1172.

Ebner, T., Moser, M., Shebl, O., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Tews, G., 2009. Morphological analysis at compacting stage is a valuable prognostic tool for ICSI patients. *Reprod Biomed Online*, 18, 61–66.

Ebner, T., Tritscher, K., Mayer, R.B., Oppelt, P., Duba, H.C., Maurer, M., Schappacher-Tilp, G., Petek, E., Shebl, O., 2016. Quantitative and qualitative trophoctoderm grading allows for prediction of live birth and gender. *J Assist Reprod Genet*, 33, 49–57.

Edwards, R.G., 1965. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*, 2, 926-9.

Edwards, R.G., Bavister, B.D., Steptoe, P.C., 1969. Early Stages of Fertilization in vitro of Human Oocytes Matured in vitro. *Nature*, 221, 632–635.

El Osta, R., Almont, T., Diligent, C., Hubert, N., Eschwège, P., Hubert, J., 2016. Anabolic steroids abuse and male infertility. *Basic Clin Androl*, 26, 2.

Ergin, E.G., Caliskan, E., Yalcinkaya, E., Oztel, Z., Cokelez, K., Ozay, A., Ozornek, O.H., 2014. Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. *Fertil Steril*, 102, 1029–1033.

Esbert, M., Godo, A., Soares, S.R., Florensa, M., Amoros, D., Ballesteros, A., Vidal, F., 2017. Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology*, 5, 807–813.

ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen E, Rubio C, Christopikou D, Dimitriadou E, Gontar J, Goossens V, Maurer M, Spinella F, Vermeulen N, De Rycke M., 2020. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod Open*, 29;2020(3):hoaa017.

ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho F, Coonen E, Goossens V, Kokkali G, Rubio C, Meijer-Hoogeveen M, Moutou C, Vermeulen N, De Rycke M., 2020. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Hum Reprod Open*, 29;2020(3):hoaa021.

Fajt, T., 2018. Poruchy plodnosti u žen. Řezáčová, J., Crha, I., Darebný, P., Fait, T., Hanáček, J., Janský, M., Konečná, H., Koubková, B., Madar, J., Malíčková, K., Mardešić T., Raušová, E., Rutarová, J., Řezáč, J., Řežábek, K., Sobek, A., Ščamburová, J., Šnajderová, M., Trávník, P., Ulčová-Gallová, Z. Reprodukční medicína. Současné možnosti v asistované reprodukci. Praha: Mladá fronta, s.62. ISBN 978-80-204-4657-2.

Fauser, B.C., Mannaerts, B.M., Devroey, P., Leader, A., Boime, I., Baird, D.T., 2009. Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update*, 15, 309-321.

Forman, E.J., Hong, K.H., Ferry, K.M., Tao, X., Taylor, D., Levy, B., Treff, N.R., Scott, R.T., 2013. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*, 100, 100–107.

Fowler, R.E, Edwards, R.G., 1957. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocrinol*, 15, 374-84.

Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Jaroudi, S., Sarasa, J., Enciso, M., Wells, D., 2013. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet*, 132, 1001-1013.

Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Wells, D., 2014. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod*, 20, 117–126.

Franasiak, J.M.; Forman, E.J.; Hong, K.H.; Werner, M.D.; Upham, K.M.; Treff, N.R.; Scott, R.T., 2014. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*, 101, 656–663.

Fréour, T., Dessolle, L., Lammers, J., Lattes, S., Barriere, P., 2013. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril*, 99, 1944–1950.

Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., Schoolcraft, W.B., 2000. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*, 73, 1155-1158.

Gardner D.K., Weissman, A., Howles, C.M. et al., 2012. Textbook of assisted of reproductive techniques. Fourth Edition. CRC Press.

Gardner, D.K., Kelly, R.L., 2017. Impact of the laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. *J Dev Orig Health Dis*, 8, 418-435.

Gardner, D.K., Balaban, B., 2016. 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*, 22, 704-718.

Goodman, L.R., Goldberg, J., Falcone, T., Austin, C., Desai, N., 2016. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril*, 205, 275-285.e10.

Greisinger, G., Diedrich, K., Devroey, P., Kolibianakis, E.M., 2006. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*, 12, 159-168.

Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K., Winston, R.M.L., 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344, 768.

Hardy, K., Winston, R.M., Handyside, A.H., 1993. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: Failure of cytokinesis during early cleavage. *J Reprod Fertil*, 98, 549–558.

- Hawksworth, D.J., Szafran, A.J., Jordan, P.W., Dobs, A.S., Herati, A.S., 2018. Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation. *Rev Urol*, 20, 56-62.
- Hollowel, J. G., Staehling, N.W., Flanders, W.D., Hannon, W.H., Gunter, E.W., Spencer, C.A., Braverman, L.E., 2002. Serum TSH, T4 and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 489-499.
- Holubcová, Z., Kyjovská, D., Martonová, M., Páralová, D., Klenková, T., Otevřel, P., Štěpánová, R., Kloudová, S., Hampl, A., 2019. Egg maturity assessment prior to ICSI prevents premature fertilization of late-maturing oocytes. *Assist Reprod Genet*, 36, 445–452.
- Homburg, R., 2005. Clomifene citrate: end of an era? A mini review. *Hum Reprod*, 20, 2043-2051.
- Hosny, A., Aerts, H., 2019. Artificial intelligence for global health. *Science*, 366, 955–956.
- Hughes, I.A., Davies, J.D., Bunch, T.I., Pasterski, V., Mastroyannopoulou, K., MacDougall, J., 2012. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet*, 380, 1419–1428.
- Hulten, M.A., Ionasson, J., Iwarsson, E., Uppal, P., Vorsanova, S.G., Yurov, Y.B., Iourov, I.Y., 2013. Trisomy 21 mosaicism: We may all have a touch of Down syndrome. *Cytogenet Genome Res*, 139, 189–192.
- Humaidan, P., Ejdrup Bredkjaer, H., Westergaard, L.G., Yding Andersen, C., 2010. 1,500 IU human chorionic gonadotropin administered at oocyte retrieval rescues the luteal phase when gonadotropin-releasing hormone agonist is used for ovulation induction: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril*, 93, 847-854.
- Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, G., Tomaselli, V., Alecci, C., Ragolia, C., Crescenzo, C., Guglielmino, A., 2013. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet*, 30, 703–710.
- Chavez, S.L., Loewke, K.E., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., Behr, B., Reijo Pera, R.A., 2012. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four cell stage. *Nat Commun*, 3, 1251.
- Ilacqua A, Izzo G, Emerenziani GP, Baldari C, Aversa A., 2018. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 16, 115.



Irani, M., Reichman, D., Robles, A., Melnick, A., Davis, O., Zaninovic, N., Xu, K., Rosenwaks, Z., 2017. Morphologic grading of euploid blastocysts 313 influences implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril*, 107, 664-670.

Kaser, D.J., Racowsky, C., 2014. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: A systematic review. *Hum Reprod Update*, 20, 617–631.

Kirkegaard, K., Hindkjaer, J.J., Grondahl, M.L., Kesmodel, U.S., Ingerslev, H.J., 2012. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet*, 29, 565–572.

Kirkegaard, K., Kesmodel, U.S., Hindkjær, J.J., Ingerslev, H.J., 2013a. Timelapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod*, 28, 2643–51.

Kirkegaard, K., Hindkjaer, J.J., Ingerslev, H.J., 2013b. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil. Steril.*, 99, 738–744.

Konstantinidis, M., Prates, R., Goodal, N., Fischer, J., Tecson, V., Lemma, T., Chu, B., Jordan, A., Armenti, E., Wells, D., Munné, S., 2015. Live births following Karyomapping of human blastocysts: experience from clinical application of the method. *Reprod Biomed Online*, 31, 394-403.

Kovacs G., 2011. *How to improve your ART success rates*. Cambridge: Cambridge University press. ISBN 978-1107648326.

Kovacs, P., 2006. Surgical treatment of early endometriosis, unexplained infertility and fertility outcomes. *Fertil Steril*, 86, 556-571.

Kovacs, P., 2014. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 124.

Krajewska-Kulak, E., Sengupta P., 2013. Thyroid Function in Male Infertility. *Front Endocrinol*, 4, 1-2.

Kubíček, V., 2015. *Mužská neplodnost – diagnostika a léčba*. České Budějovice: Androcare.

Lee, C.I., Chen, C.H., Huang, C.C., Cheng, E.H., Chen, H.H., Ho, S.T., Lin, P.Y., Lee, M.S., Lee, T.H., 2019. Embryo morphokinetics is potentially associated with clinical outcomes of single-embryo transfers in preimplantation genetic testing for aneuploidy cycles. *Reprod BioMed Online*, 39, 569–579.

Leisegang, K., Sengupta, P., Agarwal, A., Henkel, R., 2020. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia*, e13617.

Lemmen, J.G., Agerholm, I., Ziebe, S., 2008. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*, 17, 385-91.

Liu, J.H., Scheiber, M.D., 1984. The use of gonadotropin-releasing hormon for the induction of ovulation. *Clin Obstet Gynecol*, 27, 975-982.

Lou, H., Li, N., Guan, Y., Zhang, Y., Hao, D., Cui, S., 2021. Association between morphologic grading and implantation rate of Euploid blastocyst. *J Ovarian Res*, 14, 18.

Macklon, N.S., Geraedts, J.P., Fauser, B.C., 2002. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*, 2002, 8, 333-43.

Mantikou, E., Youssef, M.A., van Wely, M., van der Veen, F., Al-Inany, H. G., Repping, S., Mastenbroek, S., 2013. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 19, 210-220.

Mardešić, T., 2013. Diagnostika a léčba poruch plodnosti. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4458-2.

Marín-Briggiler, C.I., Tezón, J.G., Miranda, P.V., Vazquez-Levin, M.H., 2002. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril*, 77, 252-9.

Martín, Á., Rodrigo, L., Beltrán, D., Meseguer, M., Rubio, C., Mercader, A., de Los Santos, M.J., 2021. The morphokinetic signature of mosaic embryos: Evidence in support of their own genetic identity. *Fertil Steril*, 116, 165–173.

McPadden, J., Helm, B.M., Spangler, B.B., Ross, L.P., Boles, B.D., Schrier Vergano, S.A., 2015. Mosaic trizomy 15 in a liveborn infant. *Am J Med Genet*, 167, 821–825.

Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K.M., Ramsing, N.B., Remohi, J., 2011. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*, 26, 2658–2671.

Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., Requena, A., 2012. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril*, 98, 1481-1489.

Miki, T., Ezo, K., Kouraba, S., Ohata, K., Kato, K., 2022. Time from trophectoderm biopsy to vitrification affects the developmental competence of biopsied blastocysts. *Reprod Med Biol*, 29, 21:e12439.

Miller, D.C., Hollenbeck, B.K., Smith, G.D., Randolph, J.F., Christman, G.M., Smith, Y.R., Lebovic, D.I., Ohl, D.A., 2002. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology*, 60, 497-501.

Minasi, M.G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M.T., Greco, T., 2016. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: A consecutive case series study. *Hum Reprod*, 31, 2245–2254.

Mumusoglu, S., Yarali, I., Bozdog, D., Ozdemir, P., Polat, M., Sokmensuer, L.K., Yarali, H., 2017. Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient - and ovarian stimulation-related factors are taken into account with use of clustered data analysis. *Fertil Steril*, 107, 413–421.

Munné, S., Lee, A., Rosenwaks, Z., Grifo, J., Cohen, J., 1993. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod Oxf Engl*, 8, 2185-2191.

Munné, S., 2006. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod BioMed Online*, 12, 234–253.

Munné, S., Wells, D., 2017. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*, 107, 1085-1091.

Munoz, M., Cruz, M., Humaidan, P., Garrido, N., Pérez-Cano, I., Meseguer, M., 2013. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo development kinetics: A time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 168, 167–172.

Murugappan, G., Kim, J. G., Kort, J.D., Hanson, B.M., Neal, S.A., Tiegs, A.W., Osman, E.K., Scott, R.T., Lathi, R.B., 2020. Prognostic value of blastocyst grade after frozen euploid embryo transfer in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril. Rep.*, 1, 113-118.

Nazem, T.G., Sekhon, L., Lee, J.A., Overbey, J., Pan, S., Duke, M., Briton-Jones, C., Whitehouse, M., Copperman, A.B., Stein, D.E., 2019. The correlation between morphology and 355 implantation of euploid human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 38, 169-176.

Neuber, E., Rinaudo, P., Trimarchi, J. R., Sakkas, D., (2003). Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod*, 18, 1307–1312.

Nitzan, O., Elias, M., Chazan, B., Saliba, W., 2015. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 26, 129-136.

- Nuojua-Huttunen, S., Tomas, C., Bloigu, R., Tuomivaara, L., Martikainen, H., 1999. Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod*, 14, 698-703.
- Ostró, A., Pilka, L., Lešník, F., 2009. Reprodukční medicína – současnost a perspektivy. Olomouc: Nakladatelství Olomouc. ISBN 978-80-7182-278-3.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17-18.
- Pathak, P., Chandrashekar, A., Hakky, T.S., Pastuszak, A.W., 2016. Varicocele management in the era of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Asian J Androl*, 18, 343–348.
- Palomba, S., Santagni, S., Falbo, A., La Sala G. B., 2015. Complications and challenges associated with polycystic ovary syndrome: current perspectives. *Int J Womens Health*, 7, 745–763.
- Pennetta, F., Lagalla, C., Sciajno, R., Tarozzi, N., Nadalini, M., Zacà, C., Coticchio, G., Borini, A., 2021. The Association of Kinetic Variables with Blastocyst Development and Ploidy Status. *J. Reprod Infertil*, 22, 159-164.
- Petersen, B.M., Boel, M., Montag, M., Gardner, D.K., 2016. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Hum Reprod*, 31, 2231–2244.
- Poppe, K., Glinoeer, D., Van Steirteghem, A., Tournaye, H., Devroey, P., Schiettecatte, J., Velkeniers. B., 2002. Thyroid dysfunction and autoimmunity in infertile women. *Thyroid*, 12, 997-1001.
- Poršová - Dutoit, I., 1995. Endokrinologie v praxi. Praha: Grada, 1995. ISBN 978-80-7169-220-1.
- Rabinowitz, M.J., Huffman, P.J., Haney, N.M., Kohn, T.P., 2021. Y-Chromosome Microdeletions: A Review of Prevalence, Screening, and Clinical Considerations. *Appl Clin Genet*, 14, 51-59.
- Raheel, S., Haidong, F., Alex, J., Dillon, D., Timothy, J., Bruce G., 2018. Microfluidic—based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. *Transl Androl Urol*, 7, 336–347.
- Reignier, A., Lammers, J., Barriere, P., Freour, T., 2018. Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reprod Biomed Online*, 36, 380-387.
- Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology. ESHRE Guideline Group on good practice in IVF labs. December 2015.

Rezazadeh Valojerdi, M., Eftekhari-Yazdi, P., Karimian, L., Hassani, F., Movaghar, B., 2009. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet*, 26, 347-54.

Rienzi, L., Capalbo, A., Stoppa, M., Romano, S., Maggiulli, R., Albricci, L., Scarica, C., Farcomeni, A., Vajta, G., Ubaldi, F.M., 2015. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor prognosis patients: A longitudinal cohort study. *Reprod BioMed Online*, 30, 57–66.

Rienzi, L., Gracia, C., Maggiulli, L., LaBarbera, A.R., Kaser, D.J., Ubaldi, F.M., Vanderpoel, S., Racowsky, C., 2017. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and metaanalysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*, 23, 139-155.

Rocha, J.C., Passalia, F.J., Matos, F.D., Takahashi, M.B., Maserati, M.P., Alves, M.F., de Almeida, T.G., Cardoso, B.L., Basso, A.C., Nogueira, M.F.G., 2017a. Automatized image processing of bovine blastocysts produced in vitro for quantitative variable determination. *Scientific Data*, 4, 170192.

Rocha, J.C., Passalia, F.J., Matos, F.D., Takahashi, M.B., Ciniciato, D.S., Maserati, M.P., Alves, M.F., de Almeida, T.G., Cardoso, B.L., Basso, A.C., Nogueira, M.F.G., 2017b. A method based on artificial intelligence to fully automatize the evaluation of bovine blastocyst images. *Scientific Reports*, 7, 7659.

Rubio, C., Bellver, J., Rodrigo, L., Castellón, G., Guillén, A., Vidal, C., Giles, J., Ferrando, M., Cabanillas, S., Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C., 2017. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril*, 107, 1122-1129.

Řezáčová, J., Crha, I., Darebný, P., Fait, T., Hanáček, J., Janský, M., Konečná, H.; Koubková, B.; Madar, J.; Malíčková, K.; Mardešić T.; Raušová, E.; Rutarová, J.; Řezáč, J.; Řežábek, K.; Sobek, A.; Ščamburová, J.; Šnajderová, M.; Trávník, P.; Ulčová-Gallová, Z. Reprodukční medicína: současné možnosti v asistované reprodukci. Praha: Mladá fronta, 2018. ISBN 978-80-204-4657-2.

Řezáčová, J., 2018. Poruchy plodnosti mužů. Řezáčová, J., Crha, I., Darebný, P., Fait, T., Hanáček, J., Janský, M., Konečná, H.; Koubková, B.; Madar, J.; Malíčková, K.; Mardešić T.; Raušová, E.; Rutarová, J.; Řezáč, J.; Řežábek, K.; Sobek, A.; Ščamburová, J.; Šnajderová, M.; Trávník, P.; Ulčová-Gallová, Z. Reprodukční medicína: současné možnosti v asistované reprodukci. Praha: Mladá fronta, 2018. ISBN 978-80-204-4657-2.

Řežábek, K., 2014. Asistovaná reprodukce. 3. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-553-8.

Saksun, L., Ostró, A., 2009. Endokrinní žlázy a fertilita. Ostró, A., Pilka, L., Lešník, F., 2009. Reprodukční medicína – současnost a perspektivy. Olomouc: Nakladatelství Olomouc. ISBN 978-80-7182-278-3.

Sansone, A., Di Dato, C., de Angelis, C., Menafra, D., Pozza, C., Pivonello, R., Isidori, A., Gianfrilli, D., 2018. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrin*, 16, 3.

Scott, L., Finn, A., O'Leary, T., McLellan, S., Hill, J., 2007. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod*, 22, 230–240.

Scott, R.T., Jr., Upham, K.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Scott, K.L., Taylor, D., Tao, X., Treff, N.R., 2013. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*, 100, 697–703.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev*, 96, 55-97.

Slabý, O., 2015. Molekulární medicína. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-121-6.

Steptoe, P.C., Edwards, R.G., 1978. Birth After the Reimplantation of a Human Embryo. *The Lancet*, 312, 366.

Speroff, L., Fritz, A.M., 2011. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. ISBN 978-0-7817-7968-5.

Tesařík, J., Pilka, L., Dvořák, M., Trávník, P., 1983. Oocyte recovery, in vitro insemination, and transfer into the oviduct after its microsurgical repair at a single laparotomy. *Fertil Steril*, 39, 472-475.

Trávník, P. Klinická embryologie. Praha: Mladá fronta, 2018. ISBN 978-80-204-4940-5.

Vajta, G., Nagy, Z.P., 2006. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, 12, 779-96.

Vajta, G., Rienzi, L., Ubaldi, F.M., 2015. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*, 30, 325-333.

Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Lejeune, B., Nijs, M., Vandamme, B., Schoysman, R., 1996. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: Injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolemma. *Hum Reprod*, 11, 540–547.

Vrbíková J., 2017. Syndrom polycystických ovárií, 436-441. In: Marek J. et al. Endokrinologie, Galén, Praha, 692. ISBN 978-80-7262-484-3.

Wahl, B., Cossy-Gantner, A., Germann, S., Schwalbe, N.R., 2018. Artificial intelligence (AI) and global health: how can AI contribute to health in resource-poor settings? *BMJ Global Health*, 3, e000798.

Wale, P.L., Gardner, D.K., 2016. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update*, 22, 2-22.

Walczak-Jedrzejowska, R., Wolski, J.K., Slowikowska-Hilczer, J., 2013. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol*, 66, 60-67.

Weiss, A., Neril, R., Geslevich, J., Lavee, M., Beck-Fruchter, R., Golan, J., Shalev, E., 2014. Lag time from ovulation trigger to oocyte aspiration and oocyte maturity in assisted reproductive technology cycles: a retrospective study. *Fertil Steril*, 102, 419–423.

Wittenberger, M.D., Hagerman, R.J., Sherman, S.L., McConkie-Rosell, A., Welt, C.K., Rebar, R.W., Corrigan, E.C., Simpson, J.L., Nelson, L.M., 2007. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*, 87, 456-65.

Woolcott R, Stanger J., 1997. Potentially important variables identified by transvaginal ultrasoundguided embryo transfer. *Hum Reprod*, 12, 963-966.

Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., Pera, R.A.R., 2010. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*, 28, 1115–1121.

Wong, C., Chen, A.A., Behr, B., Shen, S., 2013. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod BioMed Online*, 26, 120–129.

Xiong, S., Liu, W., Wang, J., Liu, J., Gao, Y., Wu, L., Zhu, J., Hao, X., Li, J., Liu, D., Han, W., Huang, G., 2021a. Trophectoderm biopsy protocols may impact the rate of mosaic blastocysts in cycles with pre-implantation genetic testing for aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*, 38, 1153-1162.

Xiong, S., Liu, J.X., Liu, D.Y., Zhu, J.H., Hao, X.W., Wu, L.H., Gao, Y., Li, J.Y., Huang, G.N., 2021b. Prolonged interval time between blastocyst biopsy and vitrification compromised the outcomes in preimplantation genetic testing. *Zygote*, 29, 276-281.

Yilmaz, A., Zhang, L., Zhang, X.Y., Son, W.Y., Holzer, H., Ao, A., 2014. Chromosomal complement and clinical relevance of multinucleated embryos in PGD and PGS cycles. *Reprod BioMed Online*, 28, 380–387.

Yu, J., Chen, Z., Ni, Y., Li, Z., 2012. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod*, 27, 25-35.

Zaninovic, N., Irani, M., Meseguer, M., 2017. Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy? *Fertil Steril*, 108, 722-9.

Zhang, J.Q., Li, X.L., Peng, Y., Guo, X., Heng, B.C., Tong, G.Q., 2010. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod BioMed Online*, 20, 510–515.

Zhang, J., Tao, W., Liu, H., Yu, G., Li, M., Ma, S., Wu, K., 2017. Morphokinetic parameters from a time-lapse monitoring system cannot accurately predict the ploidy of embryos. *J Assist Reprod Genet*, 34, 1173–1178.

Zhao, Y.Y., Yu, Y., Zhang, X.W., 2018. Overall Blastocyst Quality, Trophectoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer Cycles. *Chin Med J (Engl)*, 131, 1261-1267.



## 9 Celkový seznam publikovaných prací autorky

### 9.1 Publikované práce v souvislosti s dizertační prací

Tvrdonova, K., Belaskova, S., Rumpikova, T., Rumpik, D., Myslivcova Fucikova, A., Malir F., 2022. Prediction of live birth - selection of embryos using morphokinetic parameters, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 166,7.

Tvrdonova, K., Belaskova, S., Rumpikova, T., Malenovska, A., Rumpik, D., Myslivcova Fucikova, A., Malir F., 2021. Differences in Morphokinetic Parameters and Incidence of Multinucleations in Human Embryos of Genetically Normal, Abnormal and Euploid Embryos Leading to Clinical Pregnancy. *J Clin Med*, 10, 5173.

### 9.2. Publikované práce z oboru přímo nesouvisející s dizertační prací

Motiei, M., Vaculikova, K., Cela, A., Tvrdonova, K., Khalili, R., Rumpik, D., Rumpikova, T., Glatz, Z., Saha, T., 2020. Non-Invasive Human Embryo Metabolic Assessment as a Developmental Criterion. *J Clin Med*, 9, 4094.

Popelková, P., Tvrdoňová, K., Piknerová, I., Juračková, V., Poláková, L., Rumpíková, T., Rumpík, D., 2017. Přispívá MACS k vyšší úspěšnosti IVF léčby? (poster, 27. Sympozium asistované reprodukce)

Tvrdoňová, K., Piknerová, I., Feketeová, L., Poláková, L., Rumpík, D., Malenovská, A., Urbanovská, I., 2015. Může time-lapse monitoring odhalit aneuploidní embrya? (poster, 25. Sympozium asistované reprodukce)

Hlaváčová, S., Rumpíková, T., Rumpík, D., Feketeová, L., Tvrdoňová, K., Piknerová, I., Bělašková, S., Lopatářová, M., 2014. Porovnání klíčových událostí v preimplantačním vývoji embryí při použití metody ICSI a PICSI pomocí time-lapse monitoringu. (poster, 24. Sympósium asistované reprodukce)

Tvrdoňová, K., Lupačová, D., Popelková, P., Poláková, L., Pilka, L., Rumpík, D., Homolka, Nevřiva, L., 2009. Zhoršení kvality ejakulátu u mladých českých mužů. *Gynekolog* 18, 133-137.

Tvrdohová, K., Pilka, L., Rumpík, D., Poláková, L., 2005. Ovlivňuje počet získaných oocytů při ovariální punkci následnou morfológickou kvalitu embryí? *Ceska Gynekol*, 70, 335-342.

Tvrdohová, K., Pilka, L., Rumpík, D., 2005. Morfológická kvalita embryí a její vliv na úspěšnost léčby neplodného manželství. *Gynekológ*, 14, 60-66.

## 10 Přílohy

### 10.1

**Prediction of live birth - selection of embryos using morphokinetic parameters (Predikce narození dítěte – selekce embryí pomocí morfokinetických parametrů)**

**Tvrdonova, K.**, Belaskova, S., Rumpikova, T., Rumpik, D., Myslivcova Fucikova, A., Malir F.

***Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc, Czech Republic, 166,7***

Medicine, Research & Experimental

<https://doi.org/10.5507/bp.2022.052>

Impact factor (IF)<sub>2021</sub>: 1,648 122/195 (Q3)

Article influence score (AIS)<sub>2021</sub>: 0,352 145/194 (Q3)

Podíl autorky: konceptualizace, analýza a interpretace, sběr dat, psaní článku, kritická revize článku, konečné schválení článku, celková odpovědnost

#### **Komentář:**

Publikace se věnuje identifikaci významných morfokinetických a morfologických markerů, které by mohly být prediktivním ukazatelem kvalitního embrya s dobrou perspektivou dalšího vývoje. Byly porovnávány skupiny aneuploidních a euploidních embryí a také euploidních embryí s prokázanou klinickou graviditou po kryoembryotransferu ve srovnání s euploidními embryi s negativním těhotenským testem po kryoembryotransferu.

Cílem asistované reprodukce je, aby pár léčený IVF technikami ukončil léčbu narozením zdravého dítěte. Nezbytným předpokladem úspěchu je identifikace nejlepšího embrya s vysokým implantačním a vývojovým potenciálem. Jednou z možností je vybrat euploidní embryo pomocí invazivního preimplantačního genetického vyšetření nebo je možné vybrat nejlepší embryo využitím neinvazivního time-lapse sledování, konkrétně na základě

morfokinetických parametrů a morfologických markerů, které jsou schopny pomoci takové embryo identifikovat.

Na základě výsledku léčby pacientek byla embryo rozdělena do 2 skupin – euploidní embryo, která po kryoembryotransferu (KET) vedla k narození zdravého dítěte a euploidní embryo, která po KET implantovala, ale nevykazovala akci srdeční. Na základě statistické analýzy těchto 2 skupin embryí bylo zjištěno, že morfokinetické parametry t5 (čas dělení na 5 buněk) a tSB (čas začátku blastulace) jsou signifikantně rozdílné. Tyto výsledky naznačují, že morfokinetické parametry tSB a t5 jsou prediktivní indikátory pro výběr embryo s vysokým vývojovým potenciálem a s vysokou pravděpodobností dosažení narození zdravého dítěte.

## Prediction of live birth – selection of embryos using morphokinetic parameters

Katerina Tvrdonova<sup>a,b</sup>, Silvie Belaskova<sup>c,d</sup>, Tatana Rumpikova<sup>b</sup>, David Rumpik<sup>b</sup>, Alena Myslivcova Fucikova<sup>a</sup>, Frantisek Malir<sup>a</sup>

**Background.** The goal of assisted reproduction is for a couple treated with IVF techniques to end the treatment by giving birth to a healthy baby. A necessary presumption for success is the identification of the best embryo with high implantation and developmental potential. One option is to select an euploid embryo by invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) or it is possible to select the best embryo by non-invasive time-lapse monitoring (TLM), specifically based on morphokinetic parameters and morphological markers that are able to identify an embryo with high developmental potential.

**Materials and Methods.** The study involved a total of 1060 embryos (585 euploid and 475 aneuploid embryos after PGT-A) with good morphology from 329 patients in the period 01/2016-10/2021. All embryos were cultured in a time-lapse incubator, trophectoderm (TE) cells biopsies for PGT-A examination were performed on day 5 (D5) or day 6 (D6) of culture. During the study period, 225 frozen embryo transfers (FET) of one euploid embryo were performed. Based on the treatment outcome, the embryos were divided into 2 groups – euploid embryos, which led to the birth of a healthy child, and euploid embryos that did not show fetal heartbeat (FHB) after FET.

**Results.** Based on the statistical analysis of the embryos without implantation and the embryos with live birth, it is clear that the morphokinetic parameters t5 (time of division into 5 cells) and tSB (time of start of blastulation) are significantly different.

**Conclusion.** The results suggest that of the morphokinetic parameters tSB and t5 are predictive indicators for selecting an embryo with high developmental potential and with a high probability of achieving the birth of a healthy child.

**Key words:** embryo, time-lapse, morphokinetics, implantation, live birth

Received: August 18, 2022; Revised: November 2, 2022; Accepted: December 5, 2022; Available online: December 12, 2022

<https://doi.org/10.5507/bp.2022.052>

© 2022 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

<sup>a</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University Hradec Kralove, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup>Clinic of Reproductive Medicine and Gynecology Zlin, U Lomu 638, 760 01 Zlin, Czech Republic

<sup>c</sup>Institute of Mathematics and Statistics, Faculty of Science, Masaryk University, 611 37 Brno, Czech Republic

<sup>d</sup>International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

Corresponding author: Katerina Tvrdonova, e-mail: [tvrdonova@ivfzlin.cz](mailto:tvrdonova@ivfzlin.cz)

### INTRODUCTION

The basic goal of assisted reproduction is to select a high-quality embryo that, after transfer to the uterus, will result in the birth of one healthy child. Single embryo transfer (SET) reduces the incidence of multiple pregnancies after IVF (ref.<sup>1,2</sup>). The key to successful IVF treatment is selection of embryos with high developmental potential<sup>3</sup>. Because more than half of IVF embryos are aneuploid<sup>4,5</sup>, techniques have been developed that are able to detect chromosomal abnormalities in human embryos – preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A). PGT-A is an invasive techniques where a biopsy of trophectoderm cells is required for self-genetic testing<sup>6</sup>. Modern non-invasive techniques finding a quality embryo for ET include time-lapse monitoring<sup>7</sup>, metabolomics<sup>8</sup> and proteomics<sup>9</sup>.

At present, it is not realistic for many reasons to test all developing embryos with PGT-A for all IVF patients. Morphological evaluation has long been used to assess embryo quality. Unfortunately, this assessment is highly subjective<sup>10</sup>. Static evaluations of embryos are performed only a few times during culture, and it is not possible to notice what happens when embryos are uncontrolled<sup>11,12</sup>.

Embryo morphology can vary considerably over a period of several hours, resulting in high variability in embryo evaluation<sup>13</sup>. In the last 15 years, time-lapse monitoring has been gradually introduced as a non-invasive method for the selection of quality embryos. This technology, which combines frequent imaging of developing embryos<sup>2,11</sup> with undisturbed culture conditions<sup>7,14</sup>, allows for more accurate embryo morphological assessment combined with morphokinetic evaluation<sup>15,16</sup>. Time-lapse culture systems have been verified as safe for human embryo culture<sup>12</sup> and certainly have the potential to create a culture environment leading to higher blastocyst formation<sup>17</sup>, higher number of implanted embryos and higher clinical pregnancy rate<sup>11,12,18</sup>. By using the cultivation of embryos in time-lapse incubators, it is possible to obtain important information both on embryo development, specifically embryo morphokinetics, but also on other developmental signs such as fragmentation and multinucleation of blastomeres<sup>19</sup>.

Numerous studies have investigated the relationships between morphokinetic parameters and embryonic competence<sup>2,11,12,20</sup> and between morphokinetics and embryonic ploidy<sup>21-23</sup>.

Based on evaluation of the relationships between various morphokinetic parameters and the developmental competence of the observed embryo, various selection hierarchical models were created – the first hierarchical model was created in 2011 by Meseguer<sup>11</sup>. A recent meta-analysis confirmed the importance of morphokinetic selection of embryos, as it showed an increased number of pregnancies, a higher birth rate, and a lower loss of early pregnancies<sup>24</sup>.

Despite the large number of published time-lapse studies, different and even conflicting data are presented. There is still significant controversy about which parameters are useful for predicting blastocyst stage, implantation potential, or embryonic ploidy<sup>13,25-27</sup>.

The aim of this study was to follow up and confirm the results of our previous study<sup>28</sup>, where it was found that morphokinetic predictive parameters for achieving clinical pregnancy with a high probability are t5 and tSB; and also that the presence of multinucleations in 2-cell and 4-cell embryos is associated with a higher probability of embryonic aneuploidy. This study, unlike the one mentioned above, used patients who gave birth to a healthy child after FET of one time-lapse cultured euploid embryo.

## MATERIALS AND METHODS

This retrospective cohort single-center study is based on data from the database of the Clinic of Reproductive Medicine and Gynecology Zlín. The study involved patients who completed IVF treatment at the clinic with PGT-A and culture of embryos in a time-lapse system in the period 01/2016 to 10/2021. A total of 329 patients mean age of  $33.1 \pm 4.4$  years were included. The indication for PGT-A was mainly older age of the patient, miscarriage, or implant failure in previous IVF cycles.

All laboratory procedures and materials were used the same as in the previous study<sup>28</sup>, to which this current work follows.

Ovarian stimulation and oocyte collection were performed according to standard treatment protocols. Ovarian stimulation was performed using the GnRH antagonist protocol, Decapeptyl/Dipherelin was used to induce ovulation, and oocyte collection was under ultrasound control 36 h after trigger application.

All oocytes were denuded and ICSI was performed on mature oocytes (MII) (4 h after oocyte collection). All embryos were cultured individually in an EmbryoSlide culture dish (Vitrolife) with one-step GTL medium (Vitrolife), the slide was overlaid with 1.5 mL of mineral oil (Ovoil, Vitrolife). Embryos were cultured in a time-lapse system (EmbryoScope, Vitrolife) at 37 °C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> to blastocyst or expanded blastocyst stage (D5, D6). Laser-assisted hatching (OCTAX) was performed on the D3 to open the zona pellucida and allow the trophectoderm to hernia out.

A total of 1060 morphologically high-quality embryos from 329 patients were genetically tested. Finally

there were 585 euploid and 475 aneuploid embryos after PGT-A. During the study, 225 frozen embryo transfers (FET) of 1 euploid embryo were performed. The actual biopsy of the trophectoderm was performed on all quality embryos on D5 or D6, the required quality of the embryos was 4AA, 4AB, 4BA, 5AA, 5AB, 5BA, 6AA, 6AB, 6BA according to Gardner and Scholcraft<sup>29</sup> as soon as the embryo was sufficiently hernia from the zona pellucida (minimum 10 cells) using a laser (OCTAX). TE cells were washed according to standard protocol in PVP buffer (1% polyvinylpyrrolidone), placed in a PCR microtube with 2 µL PBS buffer, frozen at -20 °C and transferred to an accredited molecular genetic laboratory, where SurePlex DNA isolation and whole genome amplification (SurePlex) was performed. DNA Amplification system, Illumina). The obtained DNA sample with a final concentration of about 50 ng/µL was examined by array-CGH (DNA labeling, on-chip hybridization – 24sure +, BlueGnome, Illumina, analysis using BlueFuse Multi software) or the chromosomal profile of the samples was determined by NGS (VeriSeq PGS Kit, Illumina). The principle of the method is the preparation of a sequencing library, where individual samples are marked with specific indices, which is then amplified and sequenced by SBS (MiSeq, Illumina). Biopsied embryos were vitrified 1 h after TE biopsy (Rapid VitBlast, Vitrolife).

For all embryos where PGT-A was performed, the image from the EmbryoScope (image every 10 min, 7 focal planes) was analyzed and all known morphokinetic and morphological data were read using EmbryoViewer software. The parameters used for the study were: duration of the second cell cycle (cc2), duration of the third mitosis – time between division of the 3-cell embryo into 4-cell embryo (s2), time to division of the embryo into 5-cell embryo (t5), time until the start of blastulation (tSB). The time of cell division is the moment when a complete septum is formed from the cytoplasmic membrane and the two new blastomers are completely separated. The blastulation initiation time (tSB) is when the first blastocoel cavity forms between embryonic cells. The incidence of multinucleation (MN) in the 2-cell and 4-cell stages was further evaluated, with each embryo with multinucleations in at least one blastomere being considered an embryo with multinucleations. The annotation was performed all the time by the one experienced embryologist. Following the menstrual cycle, the patient was prepared for frozen embryo transfer of one euploid embryo using an HRT-substituted cycle or a native cycle.

Based on the result of the blood pregnancy test (level of hCG, human chorionadotropin) and the further development of the pregnancy and its termination by the birth of a healthy child, 2 groups were created in this study: euploid embryos that led to the birth of a healthy child (n=126) and euploid embryos that did not lead to ultrasound confirmed fetal heartbeat – FHB (included embryos with negative hCG test, no visible gestational sac, gestational sac without FHB) (n=99).

The main data were continuous variables (cc2, s2, t5 and tSB). The distributions of calculated embryo timings

**Table 1.** Comparison of morphokinetic parameters in groups of PGT-A normal embryos that led to the birth of a healthy child after FET and PGT-A normal embryos where FHB was not achieved after FET (continuous variable analysis, two-sample t-test).

Parameter	Embryos - live birth n=126/mean	Embryos - no FHB n=99/mean	<i>P</i>
cc2/h	11.579	11.749	0.294
s2/h	0.671	0.608	0.483
t5/hpi	48.338	50.148	0.052
tSB/hpi	93.438	95.287	0.014

h, hours; hpi, hours post insemination; cc2, duration of the second cell cycle; s2, time between second and third mitosis; t5, time to reach 5-cell embryo; tSB, time to start of blastulation; FHB, fetal heartbeat.

from a sample of genetically normal embryos that led to the birth of a healthy child and genetically normal embryos that did not lead to implantation was tested using the Shapiro-Wilks test.

The means of samples with normal distribution and of sufficient size were compared by a two-sample t-test. In the case of non-normal distribution, the medians were compared by Man Whitney non-parametric test.

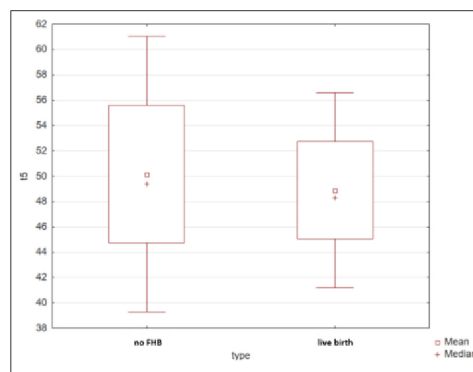
Categorical variables including MN in 2-cell and 4-cell embryos were interpreted as counts and percentages and analyzed using the Fisher Exact test. To assess the predictive values of the variables, all combinations of variables were subjected to multivariate logistic regression analysis. The many resulting combinations were tested in automated loops, so that all possible combinations from 1 to 6 concurrent parameters were explored. The only variables kept in the different trials, were these where the null hypothesis that the coefficients were insignificant had a probability below 0.05.

Results were considered significant at  $P < 0.05$ .

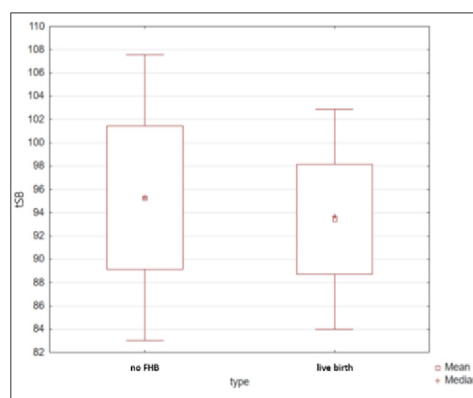
## RESULTS

The results show that PGT-A normal embryos that led to the birth of a healthy child after FET had statistically significantly different morphokinetic parameters t5 ( $P=0.05$ ) and tSB ( $P=0.01$ ) compared to the euploid embryos (post PGT-A) which after insertion into the patient's uterus did not lead to implantation or fetal heartbeat (FHB) was not demonstrated. There was no statistically significant difference in morphokinetic parameter cc2 and s2 in the groups of PGT-A normal embryos which resulted in the delivery of a healthy baby after FET and PGT-A normal embryos that did not lead to implantation and fetal heartbeat (FHB). The results are summarized in Table 1, Fig. 1 and 2.

After statistical evaluation, no statistically significant difference was detected in the incidence of multinucleations in 2-cell and 4-cell embryo stage between the groups of euploid embryos (post PGT-A) with live birth and euploid embryos (post PGT-A) embryos without FHB.



**Fig. 1.** t5 – graph of continuous variables – euploid embryos without FHB and euploid embryos with live birth. FHB, fetal heartbeat.



**Fig. 2.** tSB – graph of continuous variables – euploid embryos without FHB and euploid embryos with live birth. FHB, fetal heartbeat.

The obtained data also show that if multinucleations occur in 2-cell embryo, then there is a 9.55x higher chance of multinucleations occurring in 4-cell embryo as well as embryos without multinucleations in 2-cell stage ( $P < 0.0001$ ).

Using the stepwise regression method of the logistic model, it was found that the higher the time of the parameter t5, the greater the chance of MN occurring in 2-cell stage - every hour the chance of MN increases by 7%. The s2 parameter is significant for the occurrence of MN in 4-cell embryos.

The statistical analysis shows that the mean time of t5 and tSB is longer in patients who have failed implantation of the transferred embryo.

It is clear from the results that the parameter tSB has a significant effect on the successful termination of pregnancy by childbirth; however, the higher the tSB value, the lower the chances of delivery.

## DISCUSSION

Our study confirmed that the morphokinetic parameters tSB and t5 observed in PGT-A normal preimplantation human embryos have a statistically significant relationship with their developmental potential - achieving the delivery of a healthy child. A statistically significant difference was detected in the values of tSB and t5 parameters in the group of PGT-A normal embryos, which led to the birth of a healthy child after FET, and in the group of PGT-A normal embryos without achieving a fetal heartbeat. This is consistent with the results of our previous study<sup>28</sup>, where it was found that the values of morphokinetic parameters cc2, t5 and tSB are significantly shorter in genetically normal embryos than in genetically abnormal embryos; furthermore, tSB and t5 parameters were significantly shorter in the group of genetically normal embryos with a proven clinical pregnancy compared to genetically normal embryos with a negative pregnancy test after FET.

In addition, multinucleations in 2-cell and 4-cell embryo stage were monitored in this study, but no significant difference was found in PGT-A normal embryos that led to the birth of a healthy child and PGT-A normal embryos without FHB. In the previous study, a statistically significant difference was found in the groups of PGT-A normal and PGT-A abnormal embryos in occurrence of multinucleations in 2-cell and 4-cell embryo stage<sup>28</sup>.

The main reason for implantation failure and miscarriage in IVF treatment is the incidence of aneuploidy in oocytes and embryos, which can occur in more than 50% of human embryos and which increases with maternal age<sup>4,30</sup>. Embryos for ET are still very often selected based on their morphology on the day of ET, but it has been found that even aneuploid embryos can achieve a high morphology score on the day of ET (ref.<sup>31,32</sup>).

Evaluation of embryos using time-lapse monitoring is currently still developing and the number of embryological laboratories using this evaluation method is increasing. Many studies have tried to identify prognostic factors obtained from time-lapse monitoring that would identify a euploid embryo or embryo with high developmental potential, but their results have been different from each other<sup>25</sup>.

In our work, embryos were cultured in a time-lapse system for 5 to 6 days (D5, D6), i.e. usually to the expanded blastocyst stage. Cultivation in the time-lapse incubator (EmbryoScope<sup>®</sup>) is uninterrupted if one-step medium is used and evaluation is performed with EmbryoViewer<sup>®</sup> software using images from multiple focal planes. The camera takes pictures at a low intensity of red LED lighting (635 nm); the total exposure dose is much lower compared to standard evaluation under a laboratory microscope<sup>33</sup>. Continuous culture improves culture medium stability, which is an essential factor for blastocyst formation, and has the potential to increase the number of quality embryos in a patient's IVF cycle<sup>17</sup>. A disadvantage is that this system does not allow embryo rotation, which can negatively affect the visual assessment of the embryo,

especially when the blastomeres overlap or if the embryo has a high degree of cytoplasmic fragmentation<sup>34</sup>.

Several studies have evaluated the relationship between morphokinetic parameters derived from time-lapse monitoring (TLM) and IVF / ICSI results. Faster fertilization kinetics were associated with better embryo development<sup>35</sup>, while faster cleavage kinetics, in addition to better embryo development<sup>36-38</sup>, has also been associated with higher implantation<sup>11,21,39</sup> and higher pregnancy rate<sup>40-42</sup>. Recently, it has been shown that faster blastulation kinetics is associated with higher birth rate<sup>43</sup>. This was also confirmed in our work, namely that the parameter tSB has a significant effect on the successful completion of pregnancy.

Meseguer et al.<sup>11</sup> were among the first to publish the results of their retrospective study of morphokinetic parameters, blastomere size and multinucleation in embryos and found that embryos with t5 = 48.8 to 56.6 h had a higher chance of developing blastocysts of good morphology and have a higher implantation potential. We chose for the study the morphokinetic parameters cc2, s2, t5, tSB, the occurrence of multinucleations in the 2-cell stage and the 4-cell stage. The morphokinetic parameters and morphological markers focused on in our work have already been evaluated in the following studies: t5 (ref.<sup>21</sup>), t5 and cc2 (ref.<sup>11</sup>), s2 (ref.<sup>11,30</sup>), cc2 and s2 (ref.<sup>30,44</sup>), tSB (ref.<sup>30,45,46</sup>) and were significantly shorter in genetically normal embryos than in genetically abnormal embryos. Fishel et al.<sup>43</sup> reported that the morphokinetic parameter tSB and the duration of blastulation, dB = (tB - tSB), strongly correlate with a higher probability of live births after ET. Goodman et al.<sup>47</sup> identified tSB as the only predictive factor for implantation in their study. Campbell et al.<sup>45</sup> found that in embryos with a low risk of aneuploidy, the start of blastulation (tSB) should occur within 96.2 hpi.

A recent large-scale study evaluating 1810 transferred embryos suggested that the blastulation kinetics assessed from the start of blastulation and to blastocyst development was a better predictor of live births than classical morphology assessments<sup>48</sup>. This is in contrast to a previous smaller study involving 235 patients where the use of blastulation kinetics and early morphokinetic information did not improve the number of implanted embryos or clinical pregnancies compared with evaluation based on classical morphology<sup>47</sup>.

Minasi et al.<sup>30</sup> in their study of predictive markers at the level of blastocysts found that the morphokinetic parameters tSB - start of blastulation, tB - time of formation of a complete blastocyst, tEB - time of formation of an expanded blastocyst, tHB - time to start of hatching, were remarkably in euploid embryos shorter compared to aneuploid embryos. These results are consistent with previously published data from Campbell et al.<sup>22,45</sup>, where in euploid embryos compared to aneuploid embryos, a delay in the start of compactation (tSC), the start of tSB blastulation and the reaching of the full blastocyst phase (tB) were observed.

As already mentioned, even aneuploid embryos are able to achieve a high morphological score<sup>31,32,49</sup>. The



findings of the Del Carmen Nogales et al.<sup>50</sup> that morphokinetic parameters can be connected with the kind of chromosomal abnormality, i.e., embryos with a high degree of chromosomal abnormalities develop differently than euploid embryos, are very interesting. Surprisingly, trisomy embryos have very similar morphokinetic features to euploid embryos. The results of the study by Fragouli et al.<sup>32</sup> show that in the cleavage stage (up to stage 4–8 cells) embryo ploidy does not affect embryo morphology, on the other hand, at the blastocyst stage, a higher probability of euploidy was found in blastocysts with good morphological score and in blastocysts with faster growth progression<sup>31,32</sup>. A possible explanation is that the activation of the embryo genome begins at the stadium of 4 to 8 cells<sup>51</sup>. As a result, it is only during the third day of development that the embryo starts to express its own genes and the genetic abnormalities present begin to affect embryonic development<sup>31,32</sup>. It is necessary to mention that attempting to choose an euploid blastocyst based on its morphology alone can be highly hazardous, as many aneuploid blastocysts are capable of achieving the highest quality<sup>30</sup>.

Other published studies report that the morphokinetic parameters of implanted and non-implanted embryos<sup>37,39</sup> and euploid and aneuploid embryos<sup>52</sup> are not different. The study by the team of Barberet et al.<sup>53</sup> shows that there is no difference in morphokinetic parameters for embryos that lead to the birth of a child and for embryos that do not lead to a live birth.

The study by Fishel et al.<sup>54</sup> used morphokinetic data to select embryos for ET; a 19% more live births were found in women under 38 using their own oocytes. The benefit of using morphokinetic data from EmbryoScope for embryo selection was also evident in recipients over 37 years of age, where transfer of one blastocyst had the identical chance of giving birth as two transferred blastocysts after standard treatment, but without the risk of multiple pregnancy.

Some studies have described that morphokinetic parameters of developing embryos can be affected by non-genetic factors: e.g. the quality of the culture media<sup>55</sup>, stimulation protocols<sup>56</sup>, fertilization method<sup>36</sup>, obesity<sup>57</sup>, smoking<sup>58</sup> or lower or higher oxygen concentration in the culture environment<sup>59</sup>.

Multinucleation, which occurs in the blastomeres of early human embryos, is a common embryonic abnormality<sup>60</sup>. Aneuploidy or mosaicism appears in 50–100 % of genetically screened embryos with multinucleations<sup>49</sup>. However, it is expected that embryos, based on a “self-correction” mechanism, are capable of repairing multinucleated blastomeres, and after the following cell division, two daughter euploid blastomeres with a single nucleus are created. Most embryos with multinucleations in blastomeres are aneuploid or mosaicist, but due to the “self-correction” mechanism, some embryos may eventually develop into euploid<sup>61</sup>. The incidence of multinucleations in 2-cell embryo reduces the rate of embryo implantation after ET as well as the number of clinical pregnancies achieved<sup>19</sup>, and advances the number of aneuploidies detected<sup>62</sup>. Interestingly, a higher rate of multinucleations

was noted in the 2-cell stage and significantly declined by the changeover of the embryo to the 4-cell stage<sup>63</sup>. Our previous study proposes that a more significant indicator of aneuploidy in the embryo is the incidence of multinucleations in the 4-cell embryo<sup>28</sup>.

Objective time-lapse evaluation of embryos is better for embryo selection for its ability to generate embryos for ET that lead to live births than the conventional, subjective blastocyst morphology evaluation system<sup>48</sup>.

The use of morphokinetic parameters and morphological markers can facilitate and speed up laboratory procedures, especially in the early exclusion of embryos with abnormal development. However, the same or very similar procedures should be performed during oocyte fertilization and embryo culture to ensure comparable time-lapse results in the long duration. However, it must be acknowledged that not all of these procedures can take into account all the factors influencing the successful outcome of pregnancy, especially in the IVF population cohort; normal placental function<sup>54</sup> and endometrial susceptibility<sup>64,65</sup> are also essential.

Pribenszky et al.<sup>24</sup> confirmed in their meta-analysis that time-lapse embryo culture was correlated with a higher rate of clinical pregnancy (ongoing) and a significant increase in birth rate. Reignier et al.<sup>66</sup> analyzed the success rate and benefit of KIDScore™ day 5 morphokinetic prediction models and showed a significant correlation with the likelihoods of pregnancy and childbirth after blastocyst transfer, but with the finding that there are still opportunities to increase success.

Significant progress in the efficiency of embryo selection is expected in the next decade due to the combination of morphological, metabolic and morphokinetic data using integrative systems using artificial intelligence<sup>67</sup>.

Our work suggests that some morphokinetic parameters and morphological markers can identify an embryo that has the potential to develop into a healthy pregnancy and lead to the birth of a healthy child. Therefore, these predictive parameters from TLM should be used to select the best embryo with good developmental potential in patients who cannot undergo PGT-A or who do not wish to have invasive PGT-A examination for any reason.

## CONCLUSIONS

By means of time-lapse monitoring using the morphokinetic parameters tSB and t5, which appear to be important indicators of embryo quality, it is possible to select embryos with a high probability for implantation and further for the birth of a healthy child.

**Author contributions:** KT: conceptualization, analysis and interpretation, data collection, writing the manuscript, manuscript drafting and revision; SB: statistical analysis and interpretation; TR, DR, AMF, FM: manuscript drafting and revision.

**Conflict of interest statement:** The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, Neubourg D de, JCM D, Gerris J, Kremer JA, Martikainen H, Mol BW, Norman RJ, Thurin-Kjellberg A, Tiitinen A, van Montfoort AP, van Peperstraten AM, Van Royen E, Bhattacharya S. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ* 2010;341:c6945.
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28(10):1115-21.
- De Neubourg D, Gerris J, Van Royen E, Mangelschots K, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after IVF/CSI using embryo transfer. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2002; 64(5):361-70.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 2013;132(9):1001-13.
- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014;101(3):656-63.e1.
- Zaninovic N, Irani M, Meseguer M. Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy? *Fertil Steril* 2017;108(5):722-29.
- Wong C, Chen AA, Behr B, Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod Biomed Online* 2013;26(2):120-29.
- Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008;14(12):679-90.
- Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod* 2009;15(5):271-7.
- Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod* 2014;29(6):1173-81.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26(10):2658-71.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012;25(4):371-81.
- Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human pre-implantation embryo viability. *Hum Reprod Update* 2015;21(6):727-47.
- Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:54.
- Castelló D, Motato Y, Basile N, Remohi J, Espejo-Catena M, Meseguer M. How much have we learned from time-lapse in clinical IVF? *Mol Hum Reprod* 2016;22(10):719-27.
- Ebner T, Oppelt P, Radler E, Allerstorfer C, Habelsberger A, Mayer RB, Shebl O. Morphokinetics of vitrified and warmed blastocysts predicts implantation potential. *J Assist Reprod Genet* 2017;34(2):239-44.
- Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online* 2010;20(4):510-15.
- Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(6):565-72.
- Ergin EG, Calişkan E, Yalçinkaya E, Oztel Z, Cökelez K, Ozay A, Özörnek HM. Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2014;102(4):1029-33.e1.
- Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamics on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012;27(9):2649-57.
- Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, García-Velasco J, Meseguer M. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril* 2014;101(3):699-704.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013a;26(5):477-85.
- Chawla M, Fakhri M, Shunnar A, Bayram A, Hellani A, Perumal V, Divakaran J, Budak E. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(1):69-75.
- Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017;35(5):511-20.
- Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014;20(5):617-31.
- Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2019;5(5):CD011320.
- Chera-Aree P, Thanaboonyawat I, Thokha B, Laokirkkiat P. Comparison of pregnancy outcomes using a time-lapse monitoring system for embryo incubation versus a conventional incubator in in vitro fertilization: An age-stratification analysis. *Clin Exp Reprod Med* 2021;48(2):174-83.
- Tvrđonova K, Belaskova S, Rumpikova T, Malenovska A, Rumpik D, Myslivcova Fucikova A, Malir F. Differences in Morphokinetic Parameters and Incidence of Multinucleations in Human Embryos of Genetically Normal, Abnormal and Euploid Embryos Leading to Clinical Pregnancy. *J Clin Med* 2021;10(21):5173.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73(6):1155-8.
- Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, Spinella F, Fiorentino F, Varricchio MT, Greco E. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod* 2016;31(10):2245-54.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011;95(2):520-4.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod* 2014; 20(2):117-26.
- Li R, Pedersen KS, Liu Y, Pedersen HS, Lægdsmand M, Rickelt LF, Kühl M, Callesen H. Effect of red light on the development and quality of mammalian embryos. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(7):795-801.
- Herrero J, Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril* 2013;99(4):1030-4.
- Coticchio G, Mignini Renzini M, Novara PV, Lain M, De Ponti E, Turchi D, Fadini R, Dal Canto M. Focused time-lapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Hum Reprod* 2018;33(1):23-31.
- Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, Comi R, Fadini R. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012;25(5):474-80.
- Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2013;28(10):2643-51.
- Motato Y, de los Santos MJ, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohi J, Meseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertil Steril* 2016;105(2):376-84.e9.
- Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, Crescenzo C, Guglielmino A. The use of morphokinetic parameters

- to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(5):703-10.
40. 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(3):385-91.
  41. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012;98(6):1481-9.e10.
  42. Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014;102(5):1287-94.e5.
  43. Fishel S, Campbell A, Montgomery S, Smith R, Nice L, Duffy S, Jenner L, Berrisford K, Kellam L, Smith R, Foad F, Beccles A. Time-lapse imaging algorithms rank human preimplantation embryos according to the probability of live birth. *Reprod Biomed Online* 2018;37(3):304-13.
  44. Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, Behr B, Reijo Pera RA. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun* 2012;3:1251.
  45. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online* 2013;27(2):140-6.
  46. Mumusoglu S, Yarali I, Bozdogan G, Ozdemir P, Polat M, Sokmensuer LK, Yarali H. Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient-and ovarian stimulation-related factors are taken into account with the use of clustered data analysis. *Fertil Steril* 2017;107(2):413-21.e4.
  47. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2016;105(2):275-85.e10.
  48. Fishel S, Campbell A, Foad F, Davies L, Best L, Davis N, Smith R, Duffy S, Wheat S, Montgomery S, Wachter A, Beccles A. Evolution of embryo selection for IVF from subjective morphology assessment to objective time-lapse algorithms improves chance of live birth. *Reprod Biomed Online* 2020;40(1):61-70.
  49. Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online* 2006;12(2):234-53.
  50. Del Carmen Nogales M, Bronet F, Basile N, Martínez EM, Liñán A, Rodrigo L, Meseguer M. Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. *Fertil Steril* 2017;107(1):229-235.e2.
  51. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;332(6163):459-61.
  52. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, Scarica C, Farcomeni A, Vajta G, Ubaldi FM. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online* 2015;30(1):57-66.
  53. Barberet J, Bruno C, Valot E, Antunes-Nunes C, Jonval L, Chammas J, Choux C, Ginod P, Sagot P, Soudry-Faure A, Fauque P. Can novel early non-invasive biomarkers of embryo quality be identified with time-lapse imaging to predict live birth? *Hum Reprod* 2019;34(8):1439-449.
  54. Fishel S, Campbell A, Montgomery S, Smith R, Nice L, Duffy S, Jenner L, Berrisford K, Kellam L, Smith R, D'Cruz I, Beccles A. Live births after embryo selection using morphokinetics versus conventional morphology: a retrospective analysis. *Reprod Biomed Online* 2017;35(4):407-16.
  55. Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(9):891-900.
  56. Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer M. 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(2):167-72.
  57. Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013;28(3):794-800.
  58. Fréour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barrière P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril* 2013;99(7):1944-50.
  59. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril* 2013;99(3):738-44.e4.
  60. Hardy K, Winston RM, Handyside AH. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage. *J Reprod Fertil* 1993;98(2):549-58.
  61. Yilmaz A, Zhang L, Zhang XY, Son WY, Holzer H, Ao A. Chromosomal complement and clinical relevance of multinucleated embryos in PGD and PGS cycles. *Reprod Biomed Online* 2014;28(3):380-7.
  62. Ambroggio J, Gindoff PR, Dayal MB, Khaldi R, Peak D, Frankfurter D, Dubey AK. Multinucleation of a sibling blastomere on day 2 suggests unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertil Steril* 2011;96(4):856-59.
  63. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C. Impact of multinucleated blastomeres on embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy. *Fertil Steril* 2016;106(3):608-14.e2.
  64. Miravet-Valenciano JA, Rincon-Bertolin A, Vilella F, Simon C. Understanding and improving endometrial receptivity. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015;27(3):187-92.
  65. Nejat EJ, Ruiz-Alonso M, Simón C, Meier UT. Timing the window of implantation by nucleolar channel system prevalence matches the accuracy of the endometrial receptivity array. *Fertil Steril* 2014;102(5):1477-81.
  66. Reignier A, Girard JM, Lammers J, Chtourou S, Lefebvre T, Barrière P, Freour T. Performance of Day 5 KIDScore™ morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(11):2279-85.
  67. Curchoe CL, Bormann CL. Artificial intelligence and machine learning for human reproduction and embryology presented at ASRM and ESHRE 2018. *J Assist Reprod Genet* 2019; 6(4):591-600.

## 10.2

**Differences in Morphokinetic Parameters and Incidence of Multinucleations in Human Embryos of Genetically Normal, Abnormal and Euploid Embryos Leading to Clinical Pregnancy** (Rozdíly v morfokinetických parametrech a výskytu multinukleací u lidských embryí geneticky normálních, abnormálních a euploidních embryí vedoucích ke klinické graviditě)

**Tvrdonova, K.**, Belaskova, S., Rumpikova, T., Malenovska, A., Rumpik, D., Myslivcova Fucikova, A., Malir, F.

***Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10 (21): 5137**

Medicine, General & Internal

<https://doi.org/10.3390/jcm10215173>

Impact factor (IF)<sub>2021</sub>: 4,964 55/330 (Q1)

Article influence score (AIS)<sub>2021</sub>: 1,084 49/330 (Q1)

Podíl autorky: konceptualizace, analýza a interpretace, sběr dat, psaní článku, kritická revize článku, konečné schválení článku, celková odpovědnost

### **Komentář:**

Publikace navazuje na předchozí práci (viz. níže). V této publikaci byla navíc k rozpoznání vhodných prediktivních morfokinetických markerů porovnávána skupina euploidních embryí, které po kryoembryotransferu vedly až k porodu zdravého dítěte, a skupiny euploidních embryí bez prokázané akce srdeční plodu.

Výběr nejlepšího embrya pro embryotransfer je jedním z nejdůležitějších kroků v IVF léčbě. Preimplantační genetické testování je invazivní metoda, která může výrazně usnadnit rozhodnutí o nejlepším embryu na základě jeho genetické výbavy. Alternativním způsobem výběru embrya s největším implantačním potenciálem je kultivace v time-lapse inkubátoru. K neinvazivní selekci kvalitních embryí s vysokým implantačním potenciálem lze použít získané údaje (morfokinetické parametry a morfologické znaky) z time-lapse monitorování. Embryo pro embryotransfer je možné následně vybrat na základě doporučených morfokinetických parametrů a morfologických znaků, které dle výsledků práce predikují vyšší implantační potenciál. Ve studii byly porovnávány morfokinetické parametry a výskyt multinukleací mezi

skupinami euploidních embryí a aneuploidních embryí a euploidních embryí vedoucí po kryoembryotransferu ke klinické graviditě.

Mezi skupinou euploidních embryí a aneuploidních embryí byly zjištěny signifikantní rozdíly v morfologických parametrech cc2, t5, tSB a výskytu multinukleací ve stadiu 2- a 4-buněčného embrya. Zároveň byly zjištěny významné rozdíly v morfologických parametrech cc2, t5, tSB a výskytu multinukleací ve stadiu 2- a 4-buněčného embrya mezi skupinou euploidních embryí, která vedla ke klinické graviditě po kryoembryotransferu a skupinou aneuploidních embryí. Z morfokinetických dat zjištěných ve skupině euploidních embryí vedoucích ke klinické graviditě byly na základě statistické analýzy stanoveny časové intervaly, které by měly predikovat embrya s vysokým implantačním potenciálem. Výsledky studie ukazují, že podle morfokinetických parametrů (cc2, t5, tSB) a výskytu multinukleací během prvních dvou buněčných dělení lze s vysokou pravděpodobností vybrat nejlepší euploidní embryo pro ET.



Article

# Differences in Morphokinetic Parameters and Incidence of Multinucleations in Human Embryos of Genetically Normal, Abnormal and Euploid Embryos Leading to Clinical Pregnancy

Katerina Tvrdonova<sup>1,2,\*</sup>, Silvie Belaskova<sup>3</sup>, Tatana Rumpikova<sup>2</sup>, Alice Malenovska<sup>4</sup>, David Rumpik<sup>2</sup>, Alena Myslivcova Fucikova<sup>1</sup> and Frantisek Malir<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Hradec Kralove, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic; alena.fucikova@uhk.cz (A.M.F.); frantisek.malir@uhk.cz (F.M.)
  - <sup>2</sup> Clinic of Reproductive Medicine and Gynecology Zlin, U Lomu 638, 760 01 Zlin, Czech Republic; tatana.rumpikova@ivfzlin.cz (T.R.); david.rumpik@ivfzlin.cz (D.R.)
  - <sup>3</sup> Institute of Mathematics and Statistics, Faculty of Science, Masaryk University, 611 37 Brno, Czech Republic; silvie.belaskova@fnusa.cz
  - <sup>4</sup> Association of Reproductive Embryology, Seifertova 801/64, 633 00 Brno, Czech Republic; malenovska@hotmail.com
- \* Correspondence: tvrdonova@ivfzlin.cz; Tel.: +420-605-122-478



**Citation:** Tvrdonova, K.; Belaskova, S.; Rumpikova, T.; Malenovska, A.; Rumpik, D.; Myslivcova Fucikova, A.; Malir, F. Differences in Morphokinetic Parameters and Incidence of Multinucleations in Human Embryos of Genetically Normal, Abnormal and Euploid Embryos Leading to Clinical Pregnancy. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5173. <https://doi.org/10.3390/jcm10215173>

Academic Editor: Gabriele Tonni

Received: 24 September 2021

Accepted: 2 November 2021

Published: 5 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The selection of the best embryo for embryo transfer (ET) is one of the most important steps in IVF (in vitro fertilisation) treatment. Preimplantation genetic testing (PGT) is an invasive method that can greatly facilitate the decision about the best embryo. An alternative way to select the embryo with the greatest implantation potential is by cultivation in a time-lapse system, which can offer several predictive factors. Non-invasive time-lapse monitoring can be used to select quality embryos with high implantation potential under stable culture conditions. The embryo for ET can then be selected based on the determined morphokinetic parameters and morphological features, which according to our results predict a higher implantation potential. This study included a total of 1027 morphologically high-quality embryos (552 normal and 475 abnormal PGT-tested embryos) from 296 patients (01/2016–06/2021). All embryos were cultivated in a time-lapse incubator and PGT biopsy of trophoctoderm cells on D5 or D6 was performed. Significant differences were found in the morphological parameters cc2, t5 and tSB and the occurrence of multinucleations in the stage of two-cell and four-cell embryos between the group of genetically normal embryos and abnormal embryos. At the same time, significant differences in the morphological parameters cc2, t5 and tSB and the occurrence of multinucleations in the two-cell and four-cell embryo stage were found between the group of genetically normal embryos that led to clinical pregnancy after ET and the group of abnormal embryos. From the morphokinetic data found in the PGT-A group of normal embryos leading to clinical pregnancy, time intervals were determined based on statistical analysis, which should predict embryos with high implantation potential. Out of a total of 218 euploid embryos, which were transferred into the uterus after thawing (single frozen embryo transfer), clinical pregnancy was confirmed in 119 embryos (54.6%). Our results show that according to the morphokinetic parameters (cc2, t5, tSB) and the occurrence of multinucleations during the first two cell divisions, the best euploid embryo for ET can be selected with high probability.

**Keywords:** time-lapse monitoring; morphokinetics; multinucleation; embryo development; preimplantation genetic testing

## 1. Introduction

The goal of assisted reproduction is for the patient to give birth to a healthy child. Selecting the best embryo for embryo transfer is a long-standing effort of IVF (in vitro fertilisation) specialists. Today, in most cases, only the best embryo is transferred (elective single embryo transfer, eSET) to avoid unwanted multiple pregnancies [1,2].

Embryo selection can be performed using invasive or non-invasive technologies. Non-invasive methods include embryo morphology assessment, time-lapse monitoring, metabolomics and proteomics. Invasive techniques include embryo biopsy for genetic testing [3].

One of the important indicators of the quality of an embryo is its morphological parameters. The evaluation of preimplantation embryo morphology is subjective and can be misleading [4]. Thanks to time-lapse incubators, it is possible to evaluate these parameters without exposing developing embryos to conditions outside the incubators, where they have an ideal environment for their development [5,6]. Thanks to this technology, it is possible to evaluate embryos continuously because images are always taken at several-minute intervals [2,7]. Continuous culture time-lapse systems have been identified as safe for embryo culture [8] and potentially shape a cultivation environment leading to increased blastocyst formation [8,9] and higher rates of implantation and clinical pregnancy [7,8,10]. Thanks to the cultivation of embryos in time-lapse systems, it is possible to obtain very valuable information about the morphokinetics of the embryo and other developmental markers, such as fragmentation and multinucleations [11], which cannot be easily registered in traditional assessment under a microscope at 24-h intervals.

Because aneuploidies are the most common genetic abnormality in humans and more than 50% of IVF embryos are aneuploid [12,13], preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) is now a very well-established technique. In the last 15 years, new technologies based on whole genome amplification (CGH—Comparative Genome Hybridization, NGS—Next Generation Sequencing) have been implemented, thus expanding the possibilities of the genetic testing of embryo aneuploidies, especially increasing the ability to recognize embryonic mosaicism [14,15]. According to the recommendation of PGDIS (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, 2019), embryos up to a maximum of 20% of the mosaic are considered genetically normal.

Thanks to PGT-A, which can determine the ploidy of embryos, it is possible to increase the success of IVF treatment [16,17]. With the implementation of trophectoderm blastocyst biopsy on the fifth or sixth day of the culture (not only one or two blastomeres on the third day of embryo development) in IVF treatment cycles with PGT-A and using whole embryo genome amplification, a higher pregnancy rate was observed, especially in cycles with vitrified biopsied embryo transfer compared to cycles with fresh embryo transfer in the morning of the sixth day of the culture (with a biopsy in the morning of the fifth day of the culture) [18].

The aim of this work is to determine whether there is a relationship between genetic results after PGT-A examination (normal-euploid embryo or abnormal-aneuploid embryo) in 5- to 6-day-old human embryos cultured in a time-lapse system and morphokinetic parameters (cc2—durations of the second cell cycle, s2—duration of the 3rd mitosis, t5—time of reaching the five-cell embryo stage, tSB—time of reaching initiation of blastulation) and the occurrence of multinucleations in the two-cell embryo and four-cell embryo. In addition, an attempt is being made to determine the relationship between morphokinetic parameters and the occurrence of multinucleations in genetically normal embryos that led to clinical pregnancy after subsequent frozen embryo transfer of the examined embryo and genetically abnormal embryos. Based on the obtained results, the aim of the work is also to design time intervals for morphokinetic parameters that could be useful for the selection of embryos with high implantation potential for embryo transfer in patients who do not want or cannot undergo PGT-A.

## 2. Materials and Methods

This retrospective cohort study is based on data from the database of the Clinic of Reproductive Medicine and Gynecology Zlín. The study included patients who underwent treatment at our IVF clinic with pre-implantation genetic testing of embryos (PGT-A) and culture of embryos in a time-lapse system in the period 01/2016 to 06/2021. There were



a total of 296 patients, mean age  $32.7 \pm 4.5$  years. The indication for PGT-A was usually older maternal age, miscarriages, or failure of implantation in previous IVF cycles.

Ovarian stimulation and oocyte collection were performed according to standard treatment protocols. In most cases, ovarian stimulation was performed using the GnRH antagonist protocol, Decapeptyl or Dipherelin was applied to induce ovulation, and oocyte collection was under ultrasound control 36 h after trigger application [19,20].

All oocytes were denuded and ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) was performed on mature oocytes (MII) [21] 4 h after oocyte collection. All embryos were cultured individually in an EmbryoSlide (Vitrolife, Göteborg, Sweden) culture dish with one-step G-TL medium (medium for time-lapse culture) (Vitrolife, and the dish was overlaid with 1.5 mL of mineral oil (Ovoil, Vitrolife). Embryos were cultured in a time-lapse system (EmbryoScope, Vitrolife) at  $37^\circ\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  to blastocyst or expanded blastocyst stage (D5, D6). Laser-assisted hatching (OCTAX, Microscience GmbH; Bruckberg, Germany) was performed on D3 to open the zona pellucida so that the trophectodermal cells could herniate from the zona pellucida [22].

The study included a total of 1027 morphologically high-quality embryos (552 euploid and 475 aneuploid PGT-A-tested embryos) from 296 patients. The biopsy of the trophectoderm was performed on all quality embryos on D5 or D6 (4AA, 4AB, 4BA, 5AA, 5AB, 5BA, 6AA, 6AB, 6BA) according to Gardner and Schollcraft [1] once the trophectoderm cells sufficiently herniated from the zona pellucida (minimum 10 cells) using a laser (OCTAX). Biopsied trophectoderm cells (5–7) were washed according to standard protocol in PVP buffer (1% polyvinylpyrrolidone), placed in a PCR microtube with 2  $\mu\text{L}$  PBS buffer, frozen at  $-20^\circ\text{C}$  and transferred to an accredited molecular genetic laboratory, where SurePlex DNA isolation and whole genome amplification were performed (SurePlex DNA Amplification system, Illumina, San Diego, CA, USA). The obtained DNA sample with a final concentration of about 50 ng/ $\mu\text{L}$  was examined by arrayCGH (DNA labeling, on-chip hybridization—24 sure+, BlueGnome, Illumina, analysis using BlueFuse Multi software) or the chromosomal profile of the samples was determined by NGS (VeriSeq PGS Kit, Illumina). The principle of this method is the preparation of a sequencing library, where individual samples are marked with specific indices, which is then amplified and sequenced by SBS (MiSeq, Illumina). Biopsied embryos were vitrified 1 h after biopsy (Rapid VitBlast, Vitrolife) [23].

On all embryos, PGT-A was performed, the image from the EmbryoScope (image every 10 min, 7 focal planes) was analyzed and all known morphokinetic and morphological data were read using EmbryoViewer software. The parameters used for the study were: duration of the second cell cycle (cc2), duration of the third mitosis—the time between the division of the 3-cell embryo into a 4-cell embryo (s2), time to the division of the embryo into a 5-cell embryo (t5), time until the onset of blastulation (tSB). The time of cell division is the moment when a complete septum is formed from the cytoplasmic membrane and the two new blastomeres are completely separated. The blastulation initiation time (tSB) is when the first blastocoel cavity forms between embryonic cells. The incidence of multinucleations in the two-cell and four-cell stages of the blastomere was further evaluated, with each embryo with multinucleations in at least one blastomere being considered an embryo with multinucleations. The annotation was performed all the time by the same experienced embryologist. Following the menstrual cycle, the patient was prepared for FET (frozen embryo transfer) of one euploid embryo using an HRT (hormone replacement therapy) cycle (from the 1st day of the menstrual cycle estrogens (Estrofem) are used, from the 3rd day the transdermal estrogen spray (Lenzetto) is started, on the 13th day of the cycle the endometrial thickness is checked by ultrasound (if it is more than 7 mm the patient starts taking gestagens) and on the fifth or the sixth day of use FET is scheduled according to the age of the embryo) or a native cycle (natural menstrual cycle with ultrasound control of endometrial thickness on day 13 of the cycle; if the endometrium is at least 7 mm and the dominant follicle is larger than 15 mm, the patient starts taking gestagen from the following day, and FET is scheduled for the 5th or 6th day of use according to the age of the embryo).



Based on the result of the PGT-A examination, 2 groups of embryos were created: euploid (normal) embryos ( $n = 552$ ) and aneuploid (abnormal) embryos ( $n = 475$ ). After performing KET, the result of the pregnancy test was recorded, and if it was positive, the patient was monitored until clinical pregnancy was determined by ultrasound (fetal heartbeat)—these embryos that gave rise to clinical pregnancy were included in the third group—euploid embryos with proven clinical pregnancy ( $n = 119$ ).

Continuous data from the time-lapse analysis were interpreted as mean  $\pm$  SD (standard deviation) with respect to data distribution. Otherwise, they were interpreted as median and inter-quartile ranges (p25—lower quartile, p75—upper quartile). Two sample  $t$ -tests were used for testing the hypothesis about the means of time lapses of cell cycles. In the case of skewed data, the alternative non-parametric approach was used—Mann–Whitney  $U$ -test. Logistic regression was used to calculate the OR (odds ratio) along with a 95% CI (confidence interval). The Shapiro–Wilk test was used to test the normality of the data. Bootstrap 95% CI was calculated for the comparison of time intervals of euploid and aneuploid embryos. A standard significant level of significance was chosen to reject the null hypothesis of 0.05. All tests were two-sided. SAS software 9.4 and R software were used for all analyses.

### 3. Results

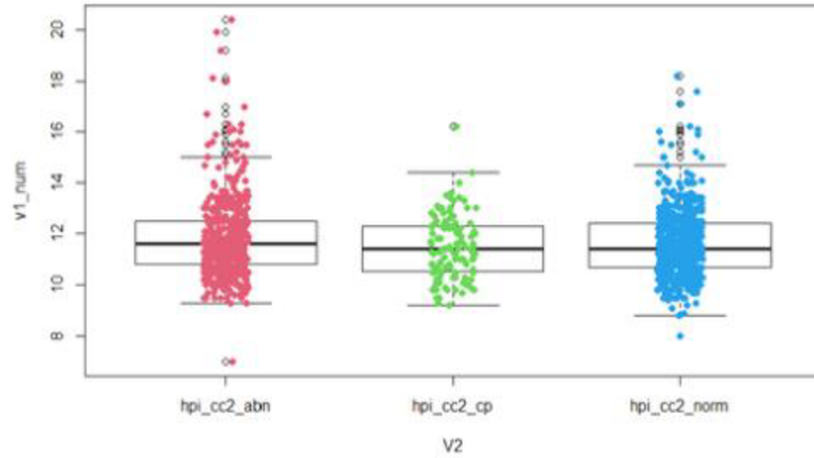
The results of the study show that PGT-A normal embryos have significantly different durations of the second cell cycle (cc2) ( $p = 0.007$ ), significantly different times of reaching the five-cell embryo stage (t5) ( $p = 0.002$ ) and a significantly different time to blastulation initiation (tSB) ( $p < 0.0001$ ) compared to the PGT-A group of abnormal embryos (aneuploid). For parameter s2, the time between division from a three-cell to a four-cell embryo (time between second and third mitosis) was not significantly different in these two groups, but a trend was observed—longer duration between division from a three-cell to a four-cell embryo in the group of aneuploid embryos (Table 1, Figures 1–3).

In the groups of euploid embryos with proven clinical pregnancy and aneuploid embryos, there are significantly different durations of the second cell cycle (cc2) ( $p = 0.006$ ), significantly different times of reaching the five-cell embryo stage (t5) ( $p = 0.004$ ) and significantly different times of reaching the initiation of blastulation (tSB) ( $p < 0.0001$ ). For parameter s2, the length between the division from a three-cell to a four-cell embryo (time between second and third mitosis) was also significantly different in the two groups ( $p = 0.021$ ). (Table 2, Figures 1–3).

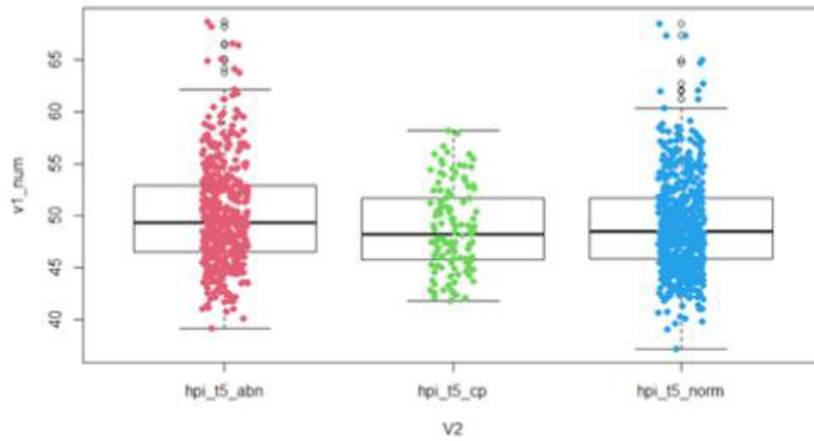
**Table 1.** Comparison of morphokinetic parameters in PGT-A groups of normal and abnormal embryos.

Parameter	Normal Embryos	Abnormal Embryos	<i>p</i> -Value
	<i>n</i> = 552, Mean $\pm$ SD	<i>n</i> = 475, Mean $\pm$ SD	
cc2/h	11.605 $\pm$ 1.321	11.856 $\pm$ 1.601	$p = 0.007$
s2/h	0.672 $\pm$ 0.714	0.841 $\pm$ 1.053	$p = 0.065$
t5/hpi	49.151 $\pm$ 4.619	50.066 $\pm$ 4.931	$p = 0.002$
tSB/hpi	94.051 $\pm$ 5.719	97.238 $\pm$ 6.737	$p < 0.0001$

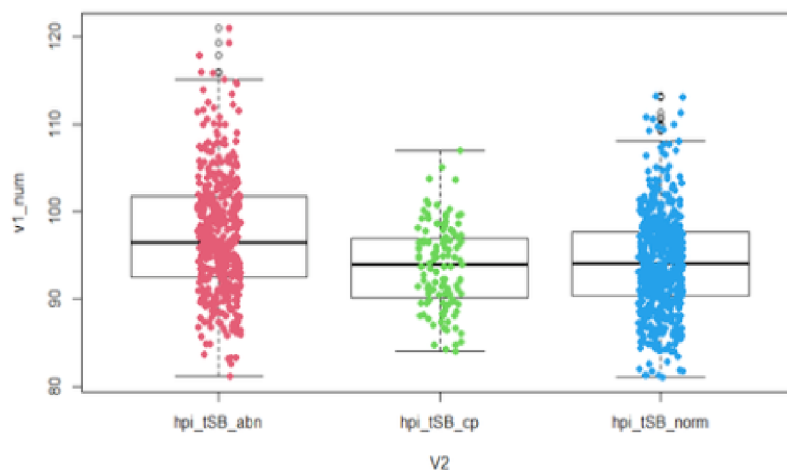
h = hours, hpi = hours post insemination, cc2 = duration of the second cell cycle, s2 = time between second and third mitosis, t5 = time to reach 5-cell embryo, tSB = time to initiate blastulation, for parameter s2 median and IQR 0.5 (0.3; 0.8).



**Figure 1.** Time-lapse distribution—cc2 in groups of PGT-A abnormal embryos, normal embryos with proven clinical pregnancy and normal embryos. Boxplot is categorized by groups: abn—PGT-A abnormal embryos, cp—PGT-A normal embryos with clinical pregnancy, norm—PGT-A normal embryos, hpi = hours post insemination, v1\_num = numerically expressed time, v2 = identification of grouped variables containing the type of embryo.



**Figure 2.** Time-lapse distribution—t5 in groups of PGT-A abnormal embryos, normal embryos with proven clinical pregnancy and normal embryos. Boxplot is categorized by groups: abn—PGT-A abnormal embryos, cp—PGT-A normal embryos with clinical pregnancy, norm—PGT-A normal embryos, hpi = hours post insemination, v1\_num = numerically expressed time, v2 = identification of grouped variables containing the type of embryo.



**Figure 3.** Time-lapse distribution—tSB in groups of PGT-A abnormal embryos, normal embryos with proven clinical pregnancy and normal embryos. Boxplot is categorized by groups: abn—PGT-A abnormal embryos, cp—PGT-A normal embryos with clinical pregnancy, norm—PGT-A normal embryos, hpi = hours post insemination, v1\_num = numerically expressed time, v2 = identification of grouped variables containing the type of embryo.

**Table 2.** Comparison of morphokinetic parameters in groups of PGT-A normal embryos with achieved clinical pregnancy and abnormal embryos.

Parameter	Normal Embryos with FHB	Abnormal Embryos	p-Value
	n = 119, Mean ± SD	n = 475, Mean ± SD	
cc2/h	11.483 ± 1.222	11.856 ± 1.601	p = 0.006
s2/h	0.635 ± 0.746	0.841 ± 1.052	p = 0.021 *
t5/hpi	48.800 ± 4.004	50.066 ± 4.931	p = 0.004
tSB/hpi	93.726 ± 4.789	97.238 ± 6.737	p < 0.0001

h = hours, hpi = hours post insemination, cc2 = duration of the second cell cycle, s2 = time between second and third mitosis, t5 = time to reach 5-cell embryo, tSB = time to initiate blastulation, FHB = fetal heartbeat, for parameter s2 median and IQR 0.5 (0.3; 0.8), \* Mann–Whitney U-test.

The results of the comparison of the groups of euploid embryos and aneuploid embryos in the incidence of multinucleations show that in the group of euploid embryos, multinucleations in the two-cell stage occur 2× (OR = 2.18, p < 0.0001) less frequently than in the group of aneuploid embryos. Compared to the incidence of multinucleations in the four-cell stage, multinucleations in the group of euploid embryos occur 6× (OR = 6.27, p < 0.0001) less frequently compared to the group of aneuploid embryos (Table 3).

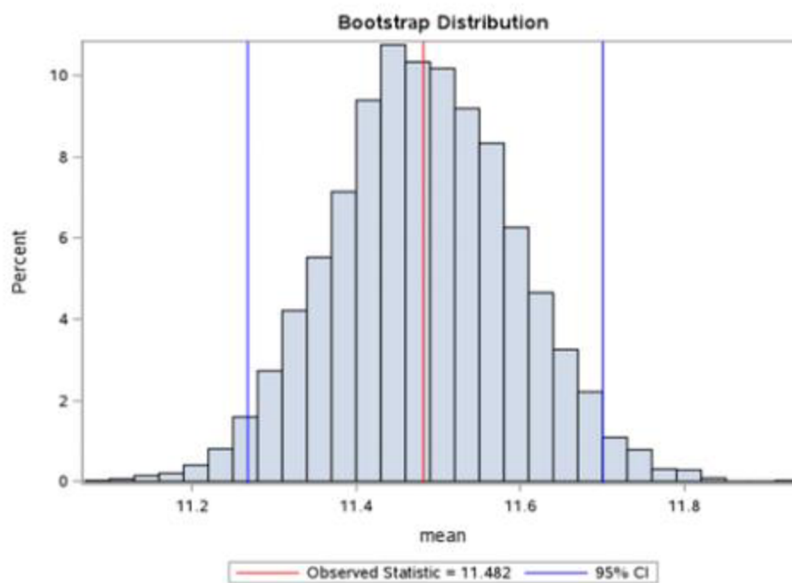
**Table 3.** Occurrence of multinucleations in 2-cell stage and 4-cell stage embryos and groups normal embryos (euploid) with proven clinical pregnancy, normal embryos (euploid) and abnormal embryos (aneuploid).

	Normal Embryos with FHB	Normal Embryos
	Odds Ratio 95%CI	Odds Ratio 95%CI
	<i>p</i> -Value	<i>p</i> -Value
	<i>n</i> = 119	<i>n</i> = 552
NM2 abnormal embryos ( <i>n</i> = 475) vs. group	2.013 (1.343; 3.028) <i>p</i> < 0.0001	2.184 (1.7; 2.810) <i>p</i> < 0.0001
NM4 abnormal embryos ( <i>n</i> = 475) vs. group	7.061 (4; 13.501) <i>p</i> < 0.0001	6.269 (4.609; 8.622) <i>p</i> < 0.0001

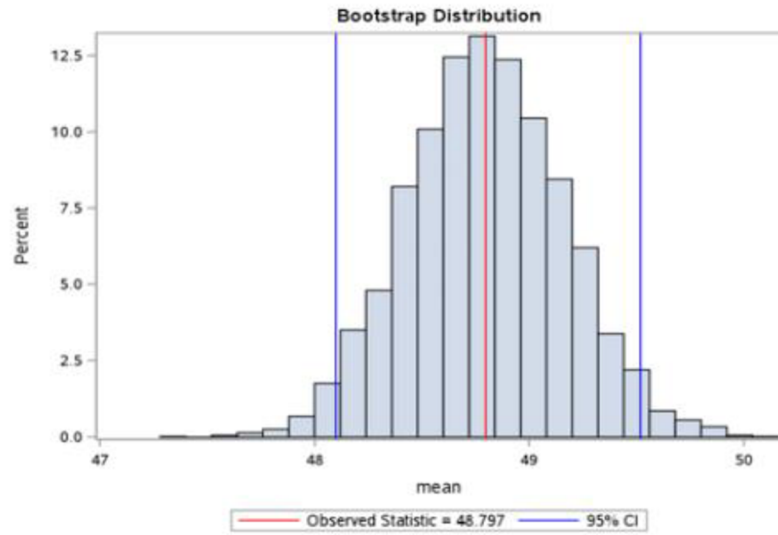
NM2 = multinucleations in 2-cell stage embryos, MN4 = multinucleations in 4-cell stage embryos, FHB = fetal heartbeat.

In the group of euploid embryos with a proven clinical pregnancy, multinucleation in the two-cell stage embryo occurs 2× less frequently (OR = 2.013, *p* < 0.0001) than in the group of aneuploid embryos. Regarding multinucleation in the group of euploid embryos with proven clinical pregnancy, multinucleations in the four-cell embryo occur 7× less frequently (OR = 7.016, *p* < 0.0001) than in the group of aneuploid embryos (Table 3).

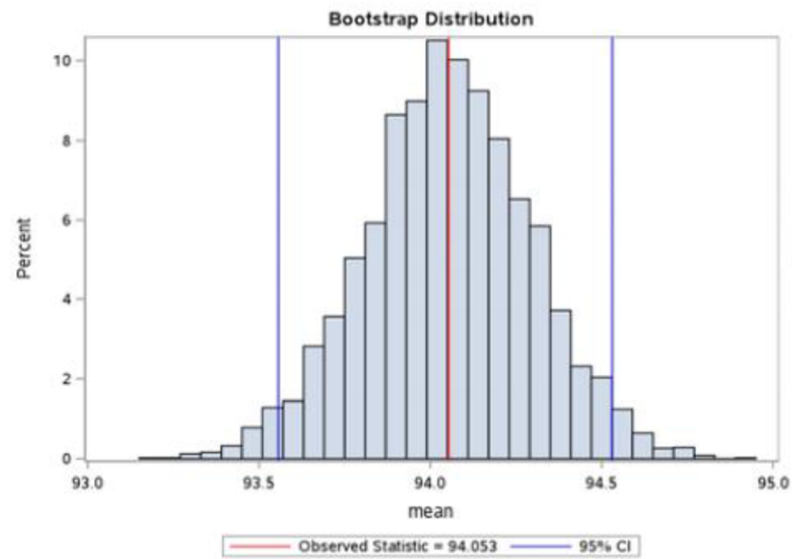
From the data obtained in our study, predictive time intervals for the selection of euploid embryos with high implantation potential were determined: cc2: 11.3–11.7 h, t5: 48.1–49.5 hpi, tSB: 92.9–94.6 hpi (Figures 4–6).



**Figure 4.** cc2: bootstrap distribution—distribution according to the duration of the 2nd cell cycle in a group of embryos with FHB (in hours). Bootstrap distribution cc2: 95% Lower CI 11.2681, 95% Upper CI 11.7004, FHB = fetal heartbeat.



**Figure 5.** t5—bootstrap distribution—distribution according to the time of reaching the 5-cell embryo stage in the group of embryos with FHB (in hpi—hours post insemination). Bootstrap distribution t5: 95% Lower CI 48.0992, 95% Upper CI 49.5181, FHB = fetal heartbeat.



**Figure 6.** tSB—bootstrap distribution—distribution according to the time of the start of blastulation in the group of embryos with FHB (in hpi—hours post insemination). Bootstrap distribution tSB: 95% Lower CI 92.8790, 95% Upper CI 94.5798, FHB = fetal heartbeat.

Finally, the morphokinetic parameters in the group of euploid embryos with proven clinical pregnancy and the group of euploid embryos without implantation after ET

were compared. Significant differences were found in the morphokinetic parameters t5 ( $p = 0.037$ ) and tSB ( $p = 0.036$ ).

#### 4. Discussion

In this study, embryos are evaluated using the PGT-A method and time-lapse monitoring with different morphokinetic and morphological results in the PGT-A group of abnormal embryos and normal embryos, as well as in the group of normal embryos that led to clinical pregnancy.

The incidence of aneuploidies in human oocytes and embryos, which affect more than 50% of embryos and whose incidence increases with maternal age, is a major reason for implantation failure and abortions in IVF cycles [24]. Embryos for embryo transfer tend to be selected on the basis of their morphology, but it has been shown that even aneuploid embryos are able to achieve a high morphological score [25].

At present, the evaluation of embryos using time-lapse monitoring is increasingly developing. Quite a number of studies have focused on determining the predictive factors obtained from cultivation in a time-lapse culture system to label a euploid embryo, but their results have been different [26].

Davis et al. [27] found a delay in the first and second cell division and a prolongation of the time between the two-cell stage and four-cell stage in aneuploid embryos. Similar conclusions that normal and abnormal embryos have different morphological parameters were made in the study by Basile et al. [28]. Chavez et al. [29] in their study found that euploid embryos have shorter and more accurate parameters up to the four-cell stage embryo.

For this study, we chose to analyze the morphokinetic parameters cc2, s2, t5 and tSB and the occurrence of multinucleations in two-cell embryos (MN2) and four-cell embryos (MN4). These morphokinetic factors and the occurrence of multinucleations were selected based on our previous unpublished research, which determined that these parameters may be related to embryonic ploidy, and the results of other authors' work on a similar topic. Efforts have been made to cover these markers throughout the culture of embryos from 2bb to the blastocyst stage. Our selected morphokinetic parameters and morphological markers were also evaluated in the following studies: t5 [28], t5, cc2 [7], s2, [7,30] cc2, s2 [29,30], tSB [30–32], and were significantly shorter in euploid embryos than in aneuploid embryos.

The researchers in the study led by Del Carmen Nogales [33] found that morphokinetic parameters may depend on the type of chromosomal abnormality, i.e., embryos with a high degree of chromosomal abnormalities behave differently than euploid embryos. In contrast, embryos with trisomy behave very similarly to euploid embryos. Other studies have found that parameters in implanted/non-implanted embryos [34,35] and euploid/aneuploid embryos [36] do not differ.

Some studies have focused on the assessment of morphokinetic parameters in embryos with varying degrees of mosaicism, because with increasing accuracy of PGT-A (NGS, hr-NGS), the number of detected mosaic embryos increases. When comparing the groups of euploid embryos and low-level mosaic embryos, no significant differences in morphokinetic parameters were found. In the group of high-level mosaic embryos, some morphokinetic parameters were delayed (e.g., t5, t8, cc3) and a higher incidence of multinucleations was found [37]. Another study shows that morphokinetic parameters of embryonic mosaics overlap the timing of cell division of euploid and aneuploid embryos [38].

Some studies have found that morphokinetic parameters may be influenced by non-genetic factors: for example, the quality of culture media [39], stimulation protocols [40], the fertilization method [41], obesity [42], smoking [43] or oxygen concentration [44].

From the group of PGT-A normal embryos that led to clinical pregnancy, time intervals were determined that should predict embryos with high implantation potential: cc2 = 11.27 h to 11.70 h, 48.10 hpi to 49.52 hpi, tSB = 92.88 hpi to 94.58 hpi.

Similar intervals for these parameters have been published for embryos with the potential to reach the blastocyst stage by Wong et al. [2], when cc2 was set at 7.8–14.3 h,



Meseguer et al. [7], who determined that  $cc2 \leq 11.9$  h, or Cruz et al. [8], who determined a time interval of 48.8–56.6 h for parameter t5. Campbell et al. [31] found an interval for the parameter tSB <96.2 h for embryos with a low risk of aneuploidy.

Multinucleations present in early embryo blastomeres are a common embryonic abnormality [43,45]. Aneuploidy or mosaicism occurred in 50–100% of genetically examined embryos with multinucleations [46]. However, it is likely that embryos, based on a self-correction mechanism, are able to repair multinucleated blastomeres, and after division, two daughter euploid blastomeres with a single nucleus are formed. It is clear that most embryos with multinucleations in blastomeres are aneuploid or mosaicist; however, due to the “self-correction” mechanism, some embryos may eventually be euploid [47]. However, it is clear that the incidence of two-cell stage multinucleations reduces the rate of embryo implantation after ET as well as the number of clinical pregnancies achieved [11], and increases the number of aneuploidies detected [48]. Interestingly, a higher rate of multinucleations was noted in the two-cell stage embryo and significantly decreased by the transition to the four-cell stage embryo [49]. Our study shows that a more significant prediction of aneuploidy in the embryo is the occurrence of multinucleations in the four-cell stage.

Some morphokinetic parameters and morphological markers may be related to the genetic equipment of the embryo and could be used to select the best embryo, especially in patients who are not indicated for PGT or who for any legal, social or economic reasons do not wish to or cannot have PGT performed.

Morphokinetic parameters and morphological features can simplify laboratory procedures, especially when discarding embryos with abnormal development. However, embryological laboratories do not always use the same validated procedures, instruments, materials and media. For instance, embryonic culture at unreduced oxygen tension (20%) is associated with increased reactive oxygen species (ROS) side effects [50], subsequently with interrupted or delayed embryonic development [51] and insufficient Inner Cell Mass development [52]. The advantage of culturing in a time-lapse system is a strictly monitored temperature, as any temperature fluctuations (exposure to room temperature) can negatively affect the development of the embryo (for example, medium change on the 3rd day of cultivation, so culturing in a one-step medium is more appropriate). If the temperature declines, the cleavage rate will also decrease. Similarly, if the pH value is shifted to the alkaline direction, embryo development may be slowed down [53]. In the case that the culture medium is supplemented with serum, it may affect the appearance of the embryo (vesicle formation, darker appearance) and cause earlier cavitation [54].

Thus, there is a need for similar procedures to be followed during oocyte fertilization and embryo culture to ensure comparable culture conditions. Then, time-lapse results from different workplaces could be better integrated into clinical practice.

## 5. Conclusions

Significant differences were found in the morphological parameters cc2, t5 and tSB and the occurrence of multinucleations (MN) in the stage of two-cell and four-cell embryos between the group of genetically normal embryos and abnormal embryos, and between the group of genetically normal embryos that led to clinical pregnancy after ET and the group of abnormal embryos. From the morphokinetic data found in the PGT-A group of euploid embryos leading to clinical pregnancy, time intervals were determined based on statistical analysis, which should predict embryos with high implantation potential: cc2: 11.3–11.7 h, t5: 48.1–49.5 hpi, tSB: 92.9–94.6 hpi. The incidence of MN in the group of euploid embryos that led to clinical pregnancy in the four-cell embryo stage is 7× lower than in the group of aneuploid embryos. In addition, significant differences were found in the morphokinetic parameters t5 and tSB in the group of euploid embryos leading to clinical pregnancy and in the group of euploid embryos that were not implanted after embryo transfer; based on these results, it is recommended that the parameters t5 and tSB be used as essential parameters in the selection of embryos. In the second phase of embryo

selection, it is appropriate to use the morphokinetic parameter cc2 and the occurrence of MN during the first two cell divisions. Based on the proposed use of these morphokinetic parameters and the occurrence of MN, the best euploid embryo for ET can be selected with high probability.

**Author Contributions:** Conceptualization: K.T., A.M. Analysis and interpretation: K.T. Data collection: K.T. Writing the article: K.T. Critical revision of the article: K.T., A.M., S.B., T.R., D.R., F.M., A.M.F. Statistical analysis: S.B. Final approval of the article: K.T., A.M., S.B., T.R., D.R., F.M., A.M.F. Overall responsibility: K.T., D.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Clinic of Reproductive Medicine and Gynecology Zlín (REK01/2016, 11 January 2016).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The authors confirm that the data supporting the findings are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Gardner, D.K.; Lane, M.; Stevens, J.; Schlenker, T.; Schoolcraft, W.B. Blastocysts score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocysts transfer. *Fertil. Steril.* **2000**, *73*, 1115–1118. [\[CrossRef\]](#)
- Wong, C.C.; Loewke, K.E.; Bossert, N.L.; Behr, B.; De Jonge, C.J.; Baer, T.M.; Pera, R.A.R. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1115–1121. [\[CrossRef\]](#)
- Zaninovic, N.; Irani, M.; Meseguer, M. Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: Is there a relation to implantation and ploidy? *Fertil. Steril.* **2017**, *108*, 722–729. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Capalbo, A.; Rienzi, L.; Cimadomo, D.; Maggiulli, R.; Elliott, T.; Wright, G.; Nagy, Z.P.; Ubaldi, F.M. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 1173–1181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wong, C.; Chen, A.A.; Behr, B.; Shen, S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod. BioMed. Online* **2013**, *26*, 120–129. [\[CrossRef\]](#)
- Desai, N.; Ploskonka, S.; Goodman, L.R.; Austin, C.; Goldberg, J.; Falcone, T. Analysis of embryo morphokinetic, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2014**, *12*, 54. [\[CrossRef\]](#)
- Meseguer, M.; Herrero, J.; Tejera, A.; Hilligsoe, K.M.; Ramsing, N.B.; Remohi, J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* **2011**, *26*, 2658–2671. [\[CrossRef\]](#)
- Cruz, M.; Garrido, N.; Herrero, J.; Perez-Cano, I.; Munoz, M.; Meseguer, M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryo is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod. BioMed. Online* **2012**, *25*, 371–381. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, J.Q.; Li, X.L.; Peng, Y.; Guo, X.; Heng, B.C.; Tong, G.Q. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod. BioMed. Online* **2010**, *20*, 510–515. [\[CrossRef\]](#)
- Kirkegaard, K.; Hindkjaer, J.J.; Grondahl, M.L.; Kesmodel, U.S.; Ingerslev, H.J. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J. Asist. Reprod. Genet.* **2012**, *29*, 565–572. [\[CrossRef\]](#)
- Ergin, E.G.; Caliskan, E.; Yalcinkaya, E.; Oztel, Z.; Cokelez, K.; Ozay, A.; Ozornek, O.H. Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 1029–1033. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fragouli, E.; Alfarawati, S.; Spath, K.; Wells, D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol. Hum. Reprod.* **2014**, *20*, 117–126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Franasiak, J.M.; Forman, E.J.; Hong, K.H.; Werner, M.D.; Upham, K.M.; Treff, N.R.; Scott, R.T. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil. Steril.* **2014**, *101*, 656–663. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hulten, M.A.; Ionasson, J.; Iwarsson, E.; Uppal, P.; Vorsanova, S.G.; Yurov, Y.B.; Iourov, I.Y. Trisomy 21 mosaicism: We may all have a touch of Down syndrome. *Cytogenet. Genome Res.* **2013**, *139*, 189–192. [\[CrossRef\]](#)
- McPadden, J.; Helm, B.M.; Spangler, B.B.; Ross, L.P.; Boles, B.D.; Schrier Vergano, S.A. Mosaic trisomy 15 in a liveborn infant. *Am. J. Med. Genet.* **2015**, *167*, 821–825. [\[CrossRef\]](#)
- Forman, E.J.; Hong, K.H.; Ferry, K.M.; Tao, X.; Taylor, D.; Levy, B.; Treff, N.R.; Scott, R.T. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: A randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 100–107. [\[CrossRef\]](#)



17. Scott, R.T., Jr.; Upham, K.M.; Forman, E.J.; Hong, K.H.; Scott, K.L.; Taylor, D.; Tao, X.; Treff, N.R. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 697–703. [[CrossRef](#)]
18. Coates, A.; Kung, A.; Mounts, E.; Hesla, J.; Bankowski, B.; Barbieri, E.; Ata, B.; Cohen, J.; Munné, S. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: A randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 123–130. [[CrossRef](#)]
19. Felberbaum, R.E.; Diedrich, K. Gonadotropin-releasing hormone antagonists: Will they replace the agonists? *Reprod. BioMed. Online* **2003**, *6*, 43–53. [[CrossRef](#)]
20. Tarlatzis, B.C.; Fauser, B.C.; Kolibianakis, E.M.; Diedrich, K.; Rombauts, L.; Devroey, P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum. Reprod. Update* **2006**, *12*, 333–340. [[CrossRef](#)]
21. Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **1992**, *340*, 17–18. [[CrossRef](#)]
22. Yang, Z.; Liu, J.; Collins, G.S.; Salem, S.A.; Liu, X.; Lyle, S.S.; Peck, A.C.; Sill, E.S.; Salem, R.D. Selection of single blastocysts for fresh transfer via stand morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: Results from a randomized pilot study. *Mol. Cytogenet.* **2012**, *5*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Desai, N.N.; Goldberg, J.M.; Austin, C.; Falcone, T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, *11*, 41. [[CrossRef](#)]
24. Fragouli, E.; Alfarawati, S.; Spath, K.; Jaroudi, S.; Sarasa, J.; Enciso, M.; Wells, D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum. Genet.* **2013**, *132*, 1001–1013. [[CrossRef](#)]
25. Alfarawati, S.; Fragouli, E.; Colls, P.; Stevens, J.; Gutiérrez-Mateo, C.; Shoolcraft, W.B.; Katz-Jaffe, M.G.; Wells, D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*, 520–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kaser, D.J.; Racowsky, C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: A systematic review. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *20*, 617–631. [[CrossRef](#)]
27. Davis, S.; Christopikou, D.; Tsorva, E.; Karagianni, A.; Handyside, A.H.; Matrominas, M. Delayed cleavage division and prolonged transition between 2- and 4-cell stages in embryos identified as aneuploidy at the 8-cell stage by array-CGH. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 84–86.
28. Basile, N.; Del Carmen Nogales, C.; Bronet, F.; Florensa, M.; Riqueros, M.; Rodrigo, M.; García-Velasco, J.; Meseguer, M. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil. Steril.* **2014**, *101*, 699–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chavez, S.L.; Loewke, K.E.; Han, J.; Moussavi, F.; Colls, P.; Munne, S.; Behr, B.; Reijo Pera, R.A. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four cell stage. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1251. [[CrossRef](#)]
30. Minasi, M.G.; Colasante, A.; Riccio, T.; Ruberti, A.; Casciani, V.; Scarselli, F.; Spinella, F.; Fiorentino, F.; Varricchio, M.T.; Greco, T. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: A consecutive case series study. *Hum. Reprod.* **2016**, *31*, 2245–2254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Campbell, A.; Fishel, S.; Bowman, N.; Duffy, S.; Sedler, M.; Hickman, C.F. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod. BioMed. Online* **2013**, *26*, 477–485. [[CrossRef](#)]
32. Mumusoglu, S.; Yarali, I.; Bozdag, D.; Ozdemir, P.; Polat, M.; Sokmensuer, L.K.; Yarali, H. Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient- and ovarian stimulation-related factors are taken into account with use of clustered data analysis. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 413–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Del Carmen Nogales, M.; Bronet, F.; Basile, N.; Martinez, E.M.; Linan, A.; Rodrigo, L.; Meseguer, M. Type of chromosome abnormality affect embryo morphology dynamics. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 229–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chamayou, S.; Patrizio, P.; Storaci, G.; Tomaselli, V.; Alecci, C.; Ragolia, C.; Crescenzo, C.; Guglielmino, A. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2013**, *30*, 703–710. [[CrossRef](#)]
35. Kirkegaard, K.; Kesmodel, U.S.; Hindkjaer, J.J.; Ingerslev, H.J. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: A prospective cohort study. *Hum. Reprod.* **2013**, *28*, 2643–2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rienzi, L.; Capalbo, A.; Stoppa, M.; Romano, S.; Maggiulli, R.; Albricci, L.; Scarica, C.; Farcomeni, A.; Vajta, G.; Ubaldi, F.M. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor prognosis patients: A longitudinal cohort study. *Reprod. BioMed. Online* **2015**, *30*, 57–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lee, C.I.; Chen, C.H.; Huang, C.C.; Cheng, E.H.; Chen, H.H.; Ho, S.T.; Lin, P.Y.; Lee, M.S.; Lee, T.H. Embryo morphokinetics is potentially associated with clinical outcomes of single-embryo transfers in preimplantation genetic testing for aneuploidy cycles. *Reprod. BioMed. Online* **2019**, *39*, 569–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Martín, Á.; Rodrigo, L.; Beltrán, D.; Meseguer, M.; Rubio, C.; Mercader, A.; de Los Santos, M.J. The morphokinetic signature of mosaic embryos: Evidence in support of their own genetic identity. *Fertil. Steril.* **2021**, *116*, 165–173. [[CrossRef](#)]
39. Ciray, H.N.; Aksoy, T.; Goktas, C.; Ozturk, B.; Bahceci, M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—A sibling oocyte study. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2012**, *29*, 891–900. [[CrossRef](#)]

40. Munoz, M.; Cruz, M.; Humaidan, P.; Garrido, N.; Pérez-Cano, I.; Meseguer, M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo development kinetics: A time-lapse study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2013**, *168*, 167–172. [[CrossRef](#)]
41. Dal Canto, M.; Coticchio, G.; Mignini Renzini, M.; De Ponti, E.; Novara, P.V.; Brambillasca, F.; Comi, R.; Fadini, R. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod. BioMed. Online* **2012**, *25*, 474–480. [[CrossRef](#)]
42. Bellver, J.; Mifsud, A.; Grau, N.; Privitera, L.; Meseguer, M. Similar morphokinetic patterns in embryo derived from obese and normoweight infertile woman: A time-lapse study. *Hum. Reprod.* **2013**, *28*, 794–800. [[CrossRef](#)]
43. Fréour, T.; Dessolle, L.; Lammers, J.; Lattes, S.; Barriere, P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 1944–1950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kirkegaard, K.; Hindkjaer, J.J.; Ingerslev, H.J. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 738–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hardy, K.; Winston, R.M.; Handyside, A.H. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: Failure of cytokinesis during early cleavage. *J. Reprod. Fertil.* **1993**, *98*, 549–558. [[CrossRef](#)]
46. Munne, S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod. BioMed. Online* **2006**, *12*, 234–253. [[CrossRef](#)]
47. Yilmaz, A.; Zhang, L.; Zhang, X.Y.; Son, W.Y.; Holzer, H.; Ao, A. Chromosomal complement and clinical relevance of multinucleated embryos in PGD and PGS cycles. *Reprod. BioMed. Online* **2014**, *28*, 380–387. [[CrossRef](#)]
48. Ambroggio, J.; Gindoff, P.R.; Dayal, M.D.; Khaldi, R.; Peak, D.; Frankfurter, D.; Dubey, A.K. Multinucleation of sibling blastomere on day 2 suggest unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertil. Steril.* **2011**, *96*, 856–859. [[CrossRef](#)]
49. Balakier, H.; Sojecki, A.; Gelareh, M.; Librach, C. Impact of multinucleated blastomeres of embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 608–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Meintjes, M.; Chantilis, S.J.; Douglas, J.D.; Rodriguez, A.J.; Guerami, A.R.; Bookout, D.M.; Barnett, B.D.; Madden, J.D. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum. Reprod.* **2009**, *24*, 300–307. [[CrossRef](#)]
51. Kovacic, B.; Vlasisavljevic, V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: A prospective study on sibling oocytes. *Reprod. BioMed. Online* **2008**, *17*, 229–236. [[CrossRef](#)]
52. Kelley, R.L.; Gardner, D.K. Combined effects of individual culture and atmospheric oxygen on preimplantation mouse embryos in vitro. *Reprod. BioMed. Online* **2016**, *33*, 537–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Swain, J.E. Optimal human embryo culture. *Semin. Reprod. Med.* **2015**, *33*, 103–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Gardner, D.K.; 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*, 704–718. [[CrossRef](#)]