

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických vied

**VÝSKYT A ÚLOHA NUKLEOVÝCH KYSELÍN V PROCESSE KULTIVÁCIE
POHLAVNÝCH BUNIEK POČAS IN VITRO FERTILIZÁCIE**

Bakalárska práca

Vedúci bakalárskej práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Odborný konzultant: doc. RNDr. Miroslava Rabajdová, Ph.D.

Košice, 2021

Dominika Remešová, DiS.

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

dátum

podpis

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcela pod'akovať vedúcej práce prof. RNDr. Lenke Skálovej, PhD., za odborné vedenie.

Ďalej chcem pod'akovať doc. RNDr. Miroslave Rabajdovej, PhD., za užitočné pripomienky, ochotu a usmernenie pri písaní bakalárskej práce.

Abstrakt

Analýza morfológie embrya a vývoj vhodných klasifikačných systémov sú nápomocné pri výbere ľudských embryí na prenos. Subjektívne morfológické hodnotenie embryí však nepredpovedá vývojový potenciál embryí s najvyššou pravdepodobnosťou úspešnej implantácie, pretože tá môže zlyhať aj pri morfológicky dokonalých embryách. Predpokladá sa však, že v blízkej budúcnosti bude pri selekcii vhodného embrya na transfer významne pomáhať neinvazívna analýza fyziológie a funkcií embryí pomocou techník ako metabolomika, proteomika, lipidomika, genomika či transkriptomika.

Veľký potenciál pre neinvazívne genetické hodnotenie preimplantačných embryí má analýza použitého kultivačného média. Analýza sa zameriava na vylučovanie širokej škály komponentov ako sú špecifické metabolity, proteíny, interleukíny a nukleové kyseliny do kultivačného média, čo môže mať prediktívny charakter najvhodnejšieho embrya pre transfer do uteru.

Abstract

The analysis of embryo morphology and development of suitable classification systems are helpful in selection of human embryos for transfer. Subjective morphological evaluation of embryos; however, does not predict the developmental potential of embryos with the highest probability of successful implantation, because even a morphologically perfect embryo is not always implanted in the uterus. It is expected that in the near future, non-invasive analysis of embryo physiology and function using techniques such as metabolomics, proteomics, lipidomics, genomics or transcriptomics will significantly help in the selection of a suitable embryo for transfer.

The analysis of used culture medium has a great potential for non-invasive genetic evaluation of preimplantation embryos. The analysis focuses at the wide range of excreted components such as specific metabolites, proteins, interleukins and nucleic acids into the culture medium, which may serve as predictive for the most suitable embryo for transfer.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cieľ	9
3	Proces <i>in vitro</i> fertilizácie	10
3.1	Odber oocytov	10
3.2	Denudácia oocytov a vyhodnotenie zrelosti	10
3.3	Separácia spermíí	11
3.4	Metódy oplodnenia	12
3.4.1	Klasické IVF	12
3.4.2	Mikromanipulačné metódy	12
3.5	Kultivačné systémy	13
3.6	Hodnotenie kvality embryí	13
3.6.1	Morfologické hodnotenie zygot – pronukleárne štádium D1	13
3.6.2	Štádium ryhovania	14
3.6.3	Deň 2 - D2	14
3.6.4	Deň 3 – D3	14
3.6.5	Deň 4 – D4	15
3.6.6	Deň 5 – D5	15
3.7	Semikontinuálne hodnotenie záznamu (Time Lapse)	16
3.8	Preimplatačné vyšetrenie embryí (PGD)	16
4	Kultivačné médium embrya	17
4.1	Faktory ovplyvňujúce embryo v kultivačnom médiu	17
4.2	pH a pufrovanie kultivačného média	17
4.3	Kyslík v kultivačnom médiu	18
4.4	Teplota kultivačného média	18
4.5	Zloženie kultivačného média	18
4.6	Typy kultivačných médií	21
5	Nové technológie analýzy kultivačných médií v asistovanej reprodukcii	22
5.1	Metabolomika kultivačného média	22
5.2	Proteomika kultivačného média	23
5.3	Lipidomika kultivačného média	24
5.4	Genomika	25
5.4.1	Genomika embrya	25
5.4.2	Genomika kultivačného média	26
5.5	Transkriptomika	27

5.5.1 Mediátorová/ messenger RNA (mRNA).....	28
5.5.2 Malé nekódujúce RNA a dlhé nekódujúce RNA.....	29
6 Záver	34
7 Zoznam skratiek	35
8 Zoznam ilustrácií	37
9 Literatúra.....	38

1 Úvod

Reprodukčná medicína je rozvíjajúci sa medicínsky odbor, pričom dopyt po jeho službách rastie z dôvodu zmien životného štýlu populácie a založenia si rodiny vo vyššom veku.

Prvé „dieťa zo skúmavky“ sa narodilo v roku 1978 vo Veľkej Británii, následkom čoho sa asistovaná reprodukcia stala fenoménom minulého storočia. V Československu došlo k úspešnému umelému oplodneniu o štyri roky neskôr a prvé slovenské dieťa po asistovanej reprodukcii sa narodilo v roku 1992 v Bratislave.

Počat' dieťa prirodzeným spôsobom nie je také jednoduché. Z roka na rok pribúda čoraz viac párov, ktoré majú problém s otehotnením. Jednou a pre väčšinu aj jedinou možnosťou ako sa stať rodičom, je umelé oplodnenie v Centre asistovanej reprodukcie.

Hoci je žena obvykle iniciátorom túžby po dieťati, problém s otehotnením už dávno nie je iba ženským problémom. V 30 % je na vine práve ženský faktor, ďalších 30 % predstavuje problém na strane muža. 25 % - 30 % párov má problém na oboch stranách a zvyšok predstavujú páry s nevysvetliteľnou príčinou neplodnosti. Mnohé páry, ktorým sa nedarí otehotnieť, nakoniec navštívia Centrum asistovanej reprodukcie. Metódy asistovanej reprodukcie sú v súčasnosti stále viac účinnejšie a bezpečnejšie.

Cieľom asistovanej reprodukčnej medicíny je príprava kvalitného embrya, ktorého kultivácia prebieha za prísnych kultivačných podmienok, a následné dosiahnutie gravidity u pacientky. Nové trendy spočívajú v prenose jediného embrya, pričom výber kvalitného embrya na transfer je kľúčový a je ovplyvnený viacerými faktormi.

Táto bakalárska práca popisuje priebeh celého procesu *in vitro* fertilizácie a možné spôsoby výberu kvalitného embrya, pričom najväčšiu pozornosť bola venovaná výskytu a úlohe nukleových kyselín v procese kultivácie v rámci reprodukčného hodnotenia kvality embryí.

2 Cieľ

Na základe literárnej rešerše popísať využitie molekulových a reprodukčných techník v *in vitro* fertilizačnom procese ako aj pri analýze vybraných biomarkerov kultivačných médií.

Vysvetliť význam a úlohu nukleových kyselín v použítom kultivačnom médiu počas kultivácie embryí v procese *in vitro* fertilizácie.

Zosumarizovať teoretické poznatky o sebernácii nukleových kyselín embrya v procese *in vitro* fertilizačnom procese, ako prognostických prediktorov vhodného embrya pre embryotransfer do uteru.

3 Proces *in vitro* fertilizácie

3.1 Odber oocytov

Odberu oocytov predchádza hormonálna stimulácia. V súčasnej dobe používa väčšina centier *in vitro* fertilizácie (IVF) metódu vaginálneho odberu oocytov, ktorá je vykonávaná pod priamou ultrazvukovou kontrolou v celkovej anestéze. Pod ultrazvukovou kontrolou je odsávaná folikulárna tekutina, ktorá obsahuje oocyt s okolitými kumulárnymi bunkami. Získaná folikulárna tekutina sa hneď po odbere odovzdá do embryologického laboratória pri dodržaní striktných podmienok a nasleduje samotné vyhľadávanie kumulárno - oocytových komplexov (Toporcerová, 2016).

3.2 Denudácia oocytov a vyhodnotenie zrelosti

Kumulus, ktorý sa nachádza okolo samotného oocytu znemožňuje správnu diagnostiku oocytu. Komplexy oocyt – kumulus sa inkubujú v roztoku hyaluronidázy, ktorá ruší medzibunkové spoje kumulárných buniek. (Toporcerová, 2016). Inkubácia musí byť čo najkratšia, maximálne 30 sekúnd. Po inkubácii sa oocyty prenesú do manipulačného média, kde sa následne dočistia. Po skončení denudácie je prevedené vyhodnotenie oocytov posúdením ich morfológie (Trávník, 2018). Po denudácii je možné identifikovať tri typy oocytov:

- **Oocyt v metafáze II (MII)**

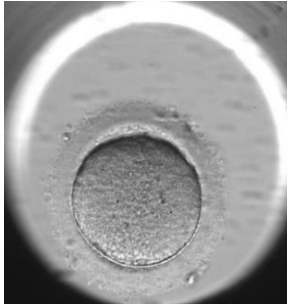
Štádium MII je charakterizované prítomnosťou pólového telieska v perivitellínnom priestore (Rienzi et al., 2008). Kumulárne bunky spolu s bunkami *coronaradiata* sú expandovaná a cytoplazma oocytu je homogénna. Chromozómová výbava je haploidná – obsahuje 23 chromozómov, 46 chromatíd. Oocyt zotrúva v tomto štádiu až do oplodnenia, po ktorom sa dokončí druhé meiotické delenie a je vylúčené druhé pólové teliesko (Toporcerová, 2016).



Obrázok 1 Oocyt v štádiu metafáza II (MII)

- **Oocyt v metafáze I (MI)**

Štádium MI je medzistupňom k zrelosti a postupuje vo vývoji k štádiu MII. Tento proces prebehne v priebehu nasledujúcich hodín. Kumulárne bunky sú už odlišiteľné od buniek *corona radiata*, cytoplazma je homogénna, poprípade centrálna granuloaná. Takýto oocyt obsahuje 46 chromozómov a každý z nich má dve chromatidy (Toporcerová, 2016).



Obrázok 2 Oocyt v štádiu metafáza I (MI)

- **Oocyt v štádiu germinatívnej vezikuly (GV)**

Štádium germinatívnej vezikuly je považované ako najmenej zrelé. Tieto oocyty nemajú dokončený proces prvého meiotického delenia. Kumulárne bunky a bunky *corona radiata* držia pevne spolu a nedajú sa od seba odlíšiť. Cytoplazma je granuloaná a prítomná je aj germinatívna vezikula. Oocyt v tomto štádiu je tetraploid, má dve sady – 46 chromozómov. (Toporcerová, 2016).



germinatívna vezikula

Obrázok 3 Oocyt v štádiu germinatívnej vezikuly (GV)

3.3 Separácia spermíí

Spermie musia byť pred použitým účelom asistovanej reprodukčnej techniky spracované. K separácii spermíí existuje niekoľko spôsobov spracovania, ako napríklad metóda „swim – up“, separácia pomocou mikrofluidných čipov, či magneticky aktivovaná selekcia spermíí (WHO, 2010).

3.4 Metódy oplodnenia

Oplodnenie pohlavných buniek prebieha v deň odberu pohlavných buniek a optimálny čas pre vykonanie oplodnenia je 2-6 hodín po odbere oocytov. V podmienkach *in vitro* existuje viacero metód pre oplodnenie, ktoré volíme na základe parametrov spermioqramu či prevládajúceho defektu (Toporcerová, 2016).

3.4.1 Klasické IVF

V prípade, že výsledky spermioqramu sú v norme a nie sú prítomné ani protilátky proti spermiami, odporúča sa oplodnenie klasickou metódou. Spočíva v spoločnej koinkubácii pohlavných buniek – vajíčok a spermii v kultivačnej miske v špeciálnom fertilizačnom médiu. Pri tomto spôsobe oplodnenia nie je potrebné vykonať denudáciu oocytov a kumulo – oocytárne komplexy sa inseminujú spermiami v koncentrácii 100 000 motilných spermii/ ml (Toporcerová, 2016).

3.4.2 Mikromanipulačné metódy

Použitie mikromanipulačných metód prináša šancu pre páry, ktoré by inak geneticky vlastné dieťa mať nemohli. Faktory ako nízky počet spermii, zlá morfológia či motilita znamenali pri klasickom IVF nízke percento fertilizácie. Z toho dôvodu boli zavedené mikromanipulačné techniky do praxe, ktoré zvyšujú úspešnosť fertilizácie (Trávník, 2018).

3.4.2.1 Intracytoplazmatická injekcia spermii

Intracytoplazmatická injekcia spermie (ICSI) je osvedčená metóda mimomaternicového oplodnenia. ICSI metóda bola predstavená ako metóda k liečbe mužskej neplodnosti s nízkou koncentráciou spermii a pohyblivosťou (Gardner et al. 2012). Princípom metódy je mechanické vpravenie jednej spermie do ooplazmy pomocou mikromanipulačných nástrojov a mikromanipulátoru (Trávník, 2018).

3.4.2.2 Preselektovaná injekcia spermii

Preselektovaná intracytoplazmatická injekcia spermie (PICSI) je metóda, ktorá pred prevedením ICSI selektuje spermie pomocou ich väzby na hyaluronan (Trávník, 2018). Hyaluronan sa nachádza v špeciálnej PICSI miske, v ktorej prebieha samotná separácia spermii (Gardner et al. 2012).

3.4.2.3 Intracytoplazmatická morfológická selekcia spermii

Metóda intracytoplazmatická morfológicky selektovaná injekcia spermie (IMSI) selektuje spermie, ktoré sú určené pre ICSI na základe ich morfológie. Táto selekcia spermii je

založená na tvare a morfológii spermie, pri ktorej sa do úvahy berú dva základné atribúty: tvar hlavičky spermie a tvar jej jadra, ktoré je hodnotené aj prítomnosťou alebo absenciou jadrových vakuol (Gardner et al. 2012).

3.5 Kultivačné systémy

Kultivačné systémy v embryológii sú tvorené komorami inkubátoru. Komory inkubátoru zaisťujú optimálnu teplotu, koncentráciu plynov a nasýtenie vodnou parou. Základné rozdiely sa líšia v tom, či umožňujú individuálnu kultiváciu jednotlivých pacientov, alebo hromadnú kultiváciu pacientov v komorovom inkubátore (Trávník, 2018).

3.6 Hodnotenie kvality embryí

Vyhodnotenie embryí z hľadiska vhodnosti na transfer či kryokonzerváciu je dôležitou súčasťou úspešného procesu IVF. V rámci hodnotenia je najviac využívané hodnotenie morfológie a dynamiky rastu a hodnotenie genómu pomocou preimplantačného genetického testovania. V súčasnej dobe je čoraz viac diskutovaný význam kvantitatívneho stanovenia mitochondrií a metódy hodnotenia metabolickej aktivity embryí (Trávník, 2018).

3.6.1 Morfologické hodnotenie zygot – pronukleárne štádium D1

Prítomnosť prvojadier poukazuje na úspešné oplodnenie a počet prvojadier svedčí o oplodnení jednou haploidnou spermiou. Kontrola prítomnosti prvojadier sa vyhodnocuje po 16-18 hodinách po inseminácii (Trávník, 2018). Oplodnené oocyty by mali mať prítomné dve pólóvé telieska a dve prvojadrá, čo znamená, že zygota obsahuje jedno mužské a jedno ženské prvojadro. Počet jadriok má byť medzi 5-7 v každom prvojadre (Trávník, 2018).



Obrázok 4 Pronukleárne štádium – dve prvojadrá

3.6.2 Štádium ryhovania

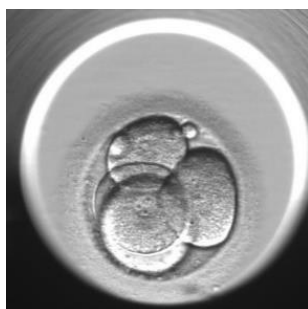
Včasné delenie dvojbunkového embrya (early cleavage), ktoré nastáva 24-26 hodín po oplodnení, je dôležitým znakom úspešného embryonálneho vývoja a dobre predikuje kvalitu neskorších štádií embryí (Trávník 2018, Toporcerová 2016).



Obrázok 5 Early cleavage štádium – dvojbunkové štádium

3.6.3 Deň 2 - D2

Embryá s vysokým implantačným potenciálom majú na druhý deň po oplodnení 4 blastoméry (Toporcerová, 2016).



Obrázok 6 Embryo v štvorbunkovom štádiu

3.6.4 Deň 3 – D3

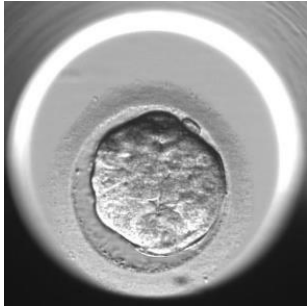
Tretí deň po oplodnení má embryo najmenej 8 blastomér, nie sú prítomné mnohoadrové blastoméry a prítomnosť fragmentácie je menej ako 20 % (Toporcerová, 2016).



Obrázok 7 Embryo v osembunkovom štádiu

3.6.5 Deň 4 – D4

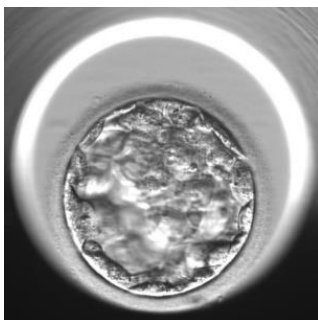
Štvrtý deň po oplodnení bunky embrya pokračujú v proliferácii a prestávajú byť okrúhle a samostatné (Toporcerová, 2016). Ľudské embryo sa na 4. deň vývoja – morula, javí ako nerozpoznatelná masa buniek. Embryo v tomto štádiu má 12-16 blastomér, a všetky blastoméry by mali byť zahrnuté do procesu kompaktácie. Tento proces je spojený s aktiváciou embryonálneho genómu a embryo začína exprimovať svoje gény (Tao et al., 2002).



Obrázok 8 Štádium kompaktovanej moruly

3.6.6 Deň 5 – D5

Rozhodujúci okamih embryonálneho vývoja je prítomnosť tekutiny, ktorá sa akumuluje medzi bunkami v štádiu kompaktovanej moruly. Akonáhle sa objem tekutiny zvýši, objaví sa dutina, ktorá postupne vytvára blastocel. Za normálnych okolností prebieha tento proces medzi 4. a 5. dňom vývoja ľudského embrya *in vitro*. (Qiansheng et al., 2020). Blastocysta je útvar, v ktorom sa bunky embrya rozdelia na vnútornú masu buniek – embryoblast, ktorá tvorí základ pre samotné embryo a trofoblast, z ktorého sa následne vyvinie placenta a obaly plodu (Toporcerová, 2016).



Obrázok 9 Štádium expandovanej blastocysty

3.7 Semikontinuálne hodnotenie záznamu (Time Lapse)

Princíp hodnotenia optického záznamu embrya je založený na postupnom snímaní mikroskopických snímok vyvíjajúcich sa embryí v intervaloch 5-20 minút. Na rozdiel od každodenných vyhodnocovaní, ktoré sa bežne vykonávajú v IVF laboratóriách, systémy analýzy snímok ponúkajú mnoho výhod, ktoré zahŕňajú nie len presné stanovenie bunkových delení, ale dôkladnejšie sledovanie morfológických udalostí ako je vznik prvojadier, mitotické delenie, kompaktáciu či blastuláciu (Kirkegaard et al., 2015). Kultivácia embryí prebieha v špeciálnych miskách s kultivačnými jamkami pod digitálnou kamerou inverzného mikroskopu. Záznam z kultivácie sa hodnotí z hľadiska morfológie a jej dynamiky, z hľadiska časovania prebiehajúcich udalostí a intervalmi medzi deleniami (Trávník, 2018).

3.8 Preimplatačné vyšetrenie embryí (PGD)

Genetická diagnostika v preimplatačnom štádiu bola prvýkrát prevedená pred viac ako 20 rokmi. Existuje mnoho prístupov k preimplatačnej genetickej diagnostike, cieľom ktorých je umožniť odlíšenie zdravých embryí od tých, ktoré sú postihnuté genetickými abnormalitami. Je možné zistiť dedičné mutácie ovplyvňujúce funkciu špecifických génov alebo abnormality počtu kópií chromozómov. Prenos geneticky normálnych embryí do maternice poskytuje vysokú pravdepodobnosť, že výsledné tehotenstvo bude zdravé (Gardner et al., 2012).

Procedúry zahŕňajú tvorbu embryí v IVF laboratóriách, následnú biopsiu a vyšetrenie embryonálneho materiálu. Odber vzoriek je možné vykonať v 4 rôznych vývojových štádiách: v deň odberu oocytov biopsiou prvého pólóvého telieska zrelého oocytu; v prvý deň biopsiou druhého pólóvého telieska zo štádia zygoty; na 3. deň kultivácie biopsiou jednej alebo dvoch blastomér včasného embrya alebo na 5-6. deň biopsiou malého zhluku buniek (5-10) trofektodermy zo štádia blastocysty (Harper et al., 2010). Kultivácia embryí prebieha v špeciálnych miskách s kultivačnými jamkami pod digitálnou kamerou inverzného mikroskopu. Záznam z kultivácie sa hodnotí z hľadiska morfológie a jej dynamiky, z hľadiska časovania prebiehajúcich udalostí a intervalmi medzi deleniami (Trávník, 2018).

4 Kultivačné médium embrya

Kvalitné kultivačné médiá musia spĺňať vysoké klasifikované požiadavky, pre fyziologický vývin embrya. Kultivačné médiá používané v súčasnej dobe vychádzajú zo zloženia tubárneho a endometriálneho sekrétu.

Kultivačné médiá sú vodné roztoky anorganických a organických látok, s mnohými špecifickými metabolickými funkciami a zaisťujú vhodnú osmolaritu, pH, redukčno-oxidačné vlastnosti, iónovú silu a ďalšie parametre média (Tyler et al., 1999).

4.1 Faktory ovplyvňujúce embryo v kultivačnom médiu

Stabilný acidobazický stav v bunkách embrya je nevyhnutný na podporu jeho vývoja, aby sa udržal stupeň ionizácie aminokyselín v bunkových proteínoch k normálnej funkcii (Tyler, et al., 1999). Embryá sa kultivujú v uzavretom systéme, ktorý sa skladá z troch oddelení: embryo, médium a plynná fáza. Stabilný acidobazický stav embrya teda závisí od vlastností a výmeny medzi týmito tromi kompartmentmi (Blerkom et al., 2004).

4.2 pH a pufrovanie kultivačného média

Vývoj embrya je ovplyvnený laboratórnym a kultivačným prostredím, ktoré zaisťujú potrebné podmienky pre ich vývoj. Pri kultivačnom médiu má dôležitú úlohu teplota, pH a koncentrácia kyslíka. Vplyv majú aj materiály použité pri kultivácii – misky, skúmavky, pipety, ktoré je potrebné testovať na možnú embryotoxicitu (Morbeck et al., 2010).

Cieľom kultivácie oocytov a embryí je udržať optimálne kultivačné podmienky blízke telesnej teplote, pričom sa minimalizuje akékoľvek kolísanie pH média a osmolarity. Hodnota pH je zvyčajne nastavená výrobcom média (7,2 – 7,4) a častokrát závisí od špecifity použitého média. Osmolarita kultivačného média je navrhnutá na 284 mOsm/ kg vody, podobne ako u krvnej plazmy. Kolísanie osmolarity sa väčšinou kontroluje vytvorením vlhkého prostredia v inkubátore. V dnešnej dobe sa v IVF laboratóriách používa olejová vrstva s kultivačným médiom (Hentemann et al., 2011). Kultivácia ľudských embryí vyžaduje prítomnosť vysokej koncentrácie bikarbonátov, a preto médiá obsahujú pufor založený na rovnováhe koncentrácie oxidu uhličitého a bikarbonátov (Trávník, 2018). Potrebná koncentrácia CO₂ v inkubátore je v rozmedzí 5 – 7 %, ktorá pri bežnom tlaku vytvorí s bikarbonátom pufor s pH 7,2 – 7,4 (Hentemann et al., 2011).

4.3 Kyslík v kultivačnom médiu

Dôležitým faktorom pri kultivácii je hladina kyslíka. Jeho obsah sa v atmosfére pohybuje okolo 20 %, ale v tkanivách je jeho hladina okolo 5 %. Kultivácia v prítomnosti 5 % kyslíka má významne menší účinok na expresiu embryonálnych génov aj na proteóm. Ľudské embryá kultivované v prostredí s nízkym obsahom kyslíka (5 %), produkujú blastocysty s podstatne väčším počtom buniek ako embryá v prostredí s vysokým obsahom kyslíka (Gardner et al., 2013). Vyššia koncentrácia kyslíka vedie k zvýšenej hladine koncentrácie aktívnych kyslíkových radikálov, a preto je táto koncentrácia pre rast embryí škodlivá. Bolo zdokumentované, že myšie embryá kultivované do štádia blastocysty v prítomnosti 20 % kyslíka zmenili génovú expresiu a narušili proteóm v porovnaní s embryami vyvinutými *in vivo*. Z toho dôvodu je pri kultivácii *in vitro* 5 % koncentrácia kyslíku považovaná za optimálnu hladinu. Koncentrácia kyslíka v inkubátore sa dá regulovať prídávaním dusíku (Boone et al. 1999, Khoudja et al. 2013).

4.4 Teplota kultivačného média

Optimálna teplota kultivácie sa pohybuje okolo 37° C. Minimálna teplota okolo 36°C nie je taká kritická ako maximálna teplota, pretože zníženie teploty iba spomalí enzymatické reakcie a nezničí ich úplne ako pri maximálnej teplote okolo 38°C (Dale et al. 1998).

4.5 Zloženie kultivačného média

Pri navrhovaní chemicky definovaného média existujú dva hlavné problémy. Prvým je výber zlúčenín v médiu a druhým je ich koncentrácia (Blerkom et al., 2004). Kultivačné médium obsahuje:

- **Anorganické katióny a anióny**

Nevyhnutnou súčasťou kultivačných médií sú sodíkové, draslíkové, vápenaté a horčíkové katióny. Spoločne zaisťujú membránový potenciál, podieľajú sa na transportných funkciách a osmotickej rovnováhe. Vápenaté ióny majú dôležitú úlohu pri aktivácii oocyty a spolu s horčíkovými iónmi sú nevyhnutnou súčasťou medzibunkových spojení.

Z anióntov sú v kultivačnom médiu prítomné sulfáty, fosfáty a bikarbonát. Fosfát sa podieľa na biosyntéze nukleových kyselín, ATP, GTP. Bikarbonát je nevyhnutný pre vývoj ľudského embrya a využíva sa v biosyntetických procesoch (Trávník, 2018).

- **Zdroje energie**

Pre včasné embryo v rôznych fázach vývoja sú hlavnými zdrojmi energie pyruvát, laktát a glukóza. Pyruvát a laktát sa uplatňujú v prvej fáze vývoja ľudských embryí, pričom od kompaktácie moruly je hlavným zdrojom energie glukóza (Trávník, 2018).

Conaghan a kol. (1993) v priamych experimentoch na ľudských embryách poukázali, že počas včasnej embryogenézy je potrebný ako zdroj energie pyruvát. Pyruvát je nevyhnutný metabolický substrát počas raného embryonálneho vývoja, pričom jeho funkcia sa uplatňuje aj pri regulácii pH, zachytávaní voľných radikálov a zneškodňovaní amónnych iónov (Quinn, 2014).

Laktát sa pridával do kultivačného média ako laktátový sirup sodný, čo predstavuje racemickú zmes D- a L- izomérov. D-izomér nemôže byť metabolizovaný, čím nepriaznivo pôsobí na bunkovú homeostázu znížením pH (Quinn, 2014).

Vynechanie glukózy v počiatočnom období viedlo k tomu, že značné množstvo embryí dosiahlo štádium ôsmich buniek a signifikantne viac buniek trofektodermu v štádiu tvorby blastocysty. Doposiaľ žiadna štúdia nepreukázala potrebu glukózy v ranom štádiu kultivácie embryí. Thompson a kol. (1992) uskutočnili štúdiu na reakcie embryí na dávky glukózy a zistili, že pri koncentráciách nad 1,5 mM je narušený vývoj ľudských embryí. Po aktivácii embryonálneho genómu sa glukóza stane nevyhnutným substrátom pre ďalší vývoj embrya do štádia blastocysty. Tradičné IVF médiá majú koncentráciu glukózy podobnú séru (2,7 – 5,6 mM), ktorá je nevyhnutná pre efektívnu kapacitáciu a hyperaktiváciu spermií, teda optimálne oplodnenie *in vitro* (Quinn, 2014).

- **Aminokyseliny**

Aminokyseliny majú v priebehu raného vývoja embryí dôležitú úlohu. Sú súčasťou média ako dôležité osmolyty, podieľajúce sa na udržaní osmotického tlaku v cytoplazme embrya. Pridaním aminokyselín do kultivačného média sa vývoj embryí približuje vývoju embryí *in vivo* (Quinn 2014, Trávník, 2018).

- **Makromolekuly**

Najčastejšie používanou makromolekulou pre implantačné médium je ľudský sérový albumín (HSA). Používa sa rekombinantný ľudský albumín, ktorý sa z virologického hľadiska považuje za bezpečný (Trávník, 2018). Používanie HSA vylúčilo mnoho nízkomolekulárnych

zložiek, ktoré zodpovedali za embryotoxicitu prípravkov. Sérový ľudský albumín je primárnym akceptorom cholesterolu, ktorý sa odstraňuje z plazmatickej membrány spermii ako hlavná zložka kapacitného procesu. HSA je preto nevyhnutnou súčasťou každého kultivačného média určeného na kapacitáciu a oplodnenie v tekutine vajcovodu *in vivo*, aby optimálne podporovala funkciu spermii (Quinn, 2014).

Súčasťou kultivačného média je ďalšia makromolekula – hyaluronan, ktorý je fyziologicky prítomný v tubárnom sekréte, podobne ako albumín. Hlavnou úlohou makromolekulárnych komponentov je ochrana bunkových membrán (Trávník, 2018).

- **Chelátory**

Ďalšou súčasťou kultivačných médií je komplexotvorné činidlo, etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). Jej funkciou je regulácia koncentrácie ťažkých kovov, ktoré sú nevyhnutné ako kofaktory enzýmov. Prítomnosť EDTA pre vývoj embrya po kompaktácii je menej vhodná, pretože blokuje glykolýzu v embryoblaste. Súčasťou syntetických náhrad séra sú komplexy chelátorov so stopovými prvkami – železo, hliník, nikel, zinok, kobalt, chróm či selén (Trávník, 2018).

- **Rastové faktory, vitamíny a ďalšie komponenty**

Súčasťou niektorých špeciálnych kultivačných médií sú rastové faktory, napríklad insulinlikegrowthfactor (IGF) alebo granulocyte-macrophagecolony-stimulating factor (GM-CSF). Rastové faktory v kultivačných médiách majú stimulovať tvorbu blastocýst (Quinn, 2014). V kultivačných médiách sú obsiahnuté vitamíny ako thiamín, biotín, riboflavín, pyridoxín, niacínamid alebo pantotenát. Ďalšie zložky vyskytujúce sa v kultivačných médiách sú cholín, inositol, taurín, citronan, ktoré vhodnou koncentráciou napodobňujú zloženie kultivačného média tubárneho a endometriálneho prostredia (Trávník, 2018).

- **Antibiotiká**

V každom kultivačnom médiu je nevyhnutnou súčasťou antibiotikum v podobe gentamicínu. Gentamicín je širokospektrálne aminoglykosidové antibiotikum, ktoré blokuje bakteriálnu proteosyntézu. Prítomný gentamicín nie je pre včasné embryá toxický (Trávník, 2018).

4.6 Typy kultivačných médií

Podľa určenia a zloženia delíme kultivačné médiá na fertilizačné, sekvenčné, jednokrokové, manipulačné a médiá bez vápnikových a horčíkových iónov (Trávník, 2018).

- **Fertilizačné médiá**

Fertilizačné médiá sa používajú pri konvenčnom oplodnení bez mikromanipulácie. Podporujú životaschopnosť a pohyblivosť spermíí. Ich súčasťou je glukóza, ktorá je nevyhnutná ako zdroj energie pre spermie, poprípade ďalšie podporné látky (Trávník, 2018).

- **Sekvenčné médiá**

Sekvenčné kultivačné médiá sú svojím zložením prispôsobené vývojovej fáze embryí, pre ktoré je určené. Embryá, ktoré sa nachádzajú v prvej fáze preimplantačného vývoja, do kompaktácie, využívajú prevažne pyruvát a laktát a dôležitou súčasťou je aminokyselina arginín, či prítomnosť malej koncentrácie EDTA. Naopak, glukóza tlmí vývoj embryí v tejto fáze. Po kompaktácii potrebujú embryá glukózu ako hlavný zdroj energie (Trávník, 2018).

- **Jednokrokové médiá**

Jednokrokové médiá sú navrhnuté tak, aby embryám poskytovali všetky komponenty počas celej kultivácie. Moderné jednokrokové médiá sú navrhnuté tak, aby zamedzili hromadeniu amónia nahradením glutamínu stabilnejšou formou pre neprerušovanú kultiváciu ľudských embryí (Reed et al., 2009).

- **Manipulačné médiá**

Manipulačné médium je vyvinuté tak, aby udržalo pH vo fyziologických hladinách aj pri práci v laboratórnej atmosfére. Bikarbonátový pufor je nahradený iným vhodným pufrom. Embryá či oocyty by mali byť v tomto type média čo najkratší čas (Trávník, 2018).

- **Médiá bez vápnikových a horčíkových iónov**

Médiá bez vápnikových a horčíkových iónov s prídavkom chelátorov sa používajú v prípade, že je potrebné rozvoľniť medzibunkové spoje. To sa využíva pri biopsii embrya 3. deň vývoja, kedy sa medzibunkové spoje začínajú formovať. V tomto type média embryo stráca schopnosť regulovať pH (Trávník, 2018).

5 Nové technológie analýzy kultivačných médií v asistovanej reprodukcii

Aplikácia „omics“ technológií v oblasti reprodukcie pod spoločným názvom reprodukčnomiká umožňuje analyzovať všetky kroky reprodukčného procesu. Termín reprodukčnomiká zahŕňa využitie metabolomiky, proteomiky, genomiky a transkriptomiky k hodnoteniu kvality embryí. Následne bioinformatika zohráva kľúčovú úlohu v procese, v ktorom zhromažďuje a analyzuje veľké množstvo údajov generovaných z reprodukčnomiky. (Horcajadas, 2018).

5.1 Metabolomika kultivačného média

V súčasnej dobe sa čoraz viac poukazuje na perspektívu neinvazívneho biomarkeru zdravia embryí. Novou technológiou, ktorá môže do budúcnosti umožniť stanovovať faktory v kultivačnom médiu embryí sa nazýva - metabolomika (Kovacs a kol., 2019). Metabolom označuje celý zoznam neproteínových zlúčenín s malými molekulami ako sú metabolické medziprodukty, ATP, mastné kyseliny, glukóza, cholesterol, hormóny a ďalšie signálne molekuly ako aj sekundárne metabolity, ktoré sa nachádzajú v biologickej vzorke. Metabolom sa neustále mení v závislosti od aktivácie a interakcie rôznych metabolických dráh v bunke (Nagy et al., 2008). Pomocou rôznych foriem spektrálnych a analytických prístupov začínajú metabolomické pokusy o stanovenie metabolitov spojených s fyziologickými a patologickými štádiami. Metabolomické štúdie embryí poukazujú na to, že embryá, ktorých výsledkom je gravidita, sa líšia svojím metabolomickým profilom v porovnaní s embryami, ktoré nevedú k tehotenstvu (Kovacs a kol., 2019).

Vyšetovanie metabolomu detekovateľného v kultivačnom médiu, v ktorom sa embryá kultivujú, využíva spektroskopickú analýzu a bioinformatiku, ktoré môžu preukázať tieto rozdiely. Bolo preukázané, že tieto rozdiely je možné detegovať v kultivačnom médiu pomocou Ramanovej a blízkej infračervenej spektroskopie (NIR). Ramanova a NIR spektroskopická analýza použitého kultivačného média embryí s preukázateľným reprodukčným potenciálom preukázala výrazne vyššie indexy životaschopnosti ako tie, ktoré sa nepodarilo implantovať. Zaujímavé je, že keď sa ľudské embryá podobnej morfológie skúmajú pomocou rovnakého spektrálneho profilu NIR, ich skóre životaschopnosti sa vo vzťahu k morfológii líši, čo naznačuje, že metabolom embryí, ktoré vyzerajú podobne, sa výrazne líši.

Jednotlivé embryá majú jedinečný profil metabolizmu, ktorý je možné merať neinvazívne stanovením zloženia použitého kultivačného média. Údaje získané zo štúdií metabolickej aktivity poukazujú na mnoho faktorov, vrátane epigenetickej modifikácie, génovej expresie, produkcie proteínov, zloženie média, dostupnosti endogénneho substrátu, redoxnej rovnováhy, kultivačných podmienok a iných faktorov kontaminantov životného prostredia. Podáva tým správu o transkriptome, epigenóme a proteóme, pretože metabolom je ich následným produktom (Kovacs a kol., 2019).

Metabolomiku možno považovať za štúdium všetkých merateľných faktorov, ktoré sú spotrebované a uvoľňované gamétou či embryom v dôsledku fyziologického metabolizmu počas vývoja a stresových reakcií. Ide o minimálne invazívny a netoxický prístup k hodnoteniu každého oocyty či embrya individuálne, s využitím kvapiek kultivačného média v kultivačných miskách, ktoré by sa inak likvidovali. Je však potrebné kultivovať embryá individuálne. Ďalšou komplikáciou pri uskutočňovaní neinvazívnych testov založených na metabolických princípoch je, že mnoho kultivačných médií nie je vhodných, pretože koncentrácie substrátu sú príliš vysoké na to, aby boli detekovateľné prebiehajúce zmeny. Tieto metódy sú však účinné, pretože poskytujú kvantitatívne údaje o spotrebe skúmaných substrátov ako sú aminokyseliny, glukóza, pyruvát či laktát počas kultivačného obdobia (Kovacs a kol., 2019).

5.2 Proteomika kultivačného média

Kombináciou proteomiky používanej k analýze sekretómu v použítom kultivačnom médiu a morfokinetická analýza by sa mohli zlúčiť a použiť ako kombinovaný prognostický nástroj na predpovedanie rýchlosti implantácie. Dominguez et al., (2015) poukázali na prítomnosť resp. neprítomnosť interleukínu 6 (IL-6) v médiu, ktorý by sa mohol používať ako prognostický faktor. IL-6 detegovaný v médiu je s najväčšou pravdepodobnosťou produkovaný embryom, pretože IL-6 nebol zistený v žiadnom z negatívnych kontrol, kde embryá neboli kultivované. Epitelové bunky endometria sú jedným z hlavných zdrojov IL-6 a predpokladá sa, že tento cytokín môže pomôcť embryu pri vývoji. V kultivačnom médiu bol tiež detegovaný chemokínový ligand 13 (CXCL13) pri embryách, ktoré sa implantovali v porovnaní s neimplantovanými. V rámci štúdie bolo zistené, že niektoré proteíny ako ACF, IL-6 a IFN- α 2, v kombinácii s morfokinetickými parametrami sú dobrým indikátorom implantácie embrya (Dominguez et al., 2010). Mains et al., (2011) publikovali štúdiu, v ktorej pojednávali o apolipoproteíne 1 produkovaným ľudským embryom a ich výsledky naznačujú, že metabolizmus cholesterolu je dôležitým aspektom produkcie morfologicky kvalitných embryí.

Mediátorová RNA ApoA1 nie je produkovaná v trojdňových embryách, ale jeho prítomnosť bola zaznamenaná v štádiu blastocysty, čo naznačuje, že ApoA1 je súčasťou embryonálneho transkriptómu aktivovaného v osembunkovom štádiu ľudských embryí (Telford et al., 1990). Vplyv ApoA1 a „HDL“ cholesterolu vo vývoji embrya do štádia blastocysty môže byť dôležitým aspektom v optimalizácii zložiek kultivačného média embryí. Zvýšené hladiny ApoA1 v použitom kultivačnom médiu v štádiu blastocysty s vysokou morfológickou kvalitou môžu súvisieť s implantačným potenciálom embrya. Toto zistenie môže prispieť k objektívnemu hodnoteniu kvality embrya a potenciálnemu výsledku tehotenstva, čím by sa obmedzili problémy spojené s viacpočetným tehotenstvom. Transkripty mRNA ApoA1 boli detegované v blastocystách kvantitatívnou RT-PCR (Mains et al., 2011).

5.3 Lipidomika kultivačného média

Regulácia lipidového metabolizmu sa v posledných rokoch stala významnou oblasťou záujmu. Zníženie plodnosti pri dyslipidémii spôsobenej čiastočne v dôsledku globálnej epidémie obezity či stavov ako metabolický syndróm, diabetes mellitus a syndróm polycystických ovárií znamená, že lepšie pochopenie súvislostí medzi metabolizmom lipidov, plodnosťou a zdravím dospelých môže byť dôležité pre súčasnú a budúcu liečbu plodnosti. Oocyt má relatívne veľkú zásobu lipidov vo forme triacylglycerolov (TAG). Celkové množstvo TAG je zásobou energie počas dozrievania oocytov a skorého vývoja embrya. Nie je však zatiaľ možné hodnotiť TAG neinvazívnymi spôsobmi. Celkové množstvo TAG a zloženie MK vo folikulárnej tekutine závisí od obsahu krvnej plazmy. Okrem týchto kľúčových úloh v oocytoch a embryách majú lipidy tiež niekoľko ďalších dôležitých úloh v bunkách cicavcov, vrátane kľúčových zložiek membrány, bunkovej signalizácie a posttranslačnej modifikácie proteínov. Rozšírenie metabolomiky a proteomiky ponúka charakterizáciu lipidových druhov vrátane ich biologických úloh. Lipidomika často kombinuje chromatografiu s tandemovou MS/MS. Najprv sa komplexné zmesi lipidov oddelia chromatografiou, pričom sa použijú rôzne typy chromatografie v závislosti od požadovanej lipidovej triedy.

V súčasnosti sa uvažuje o možnosti využitia lipidomických prístupov pri identifikácii receptivity endometria. Pomocou modelu hovädzieho dobytku boli identifikované rozdiely v zložení fosfolipidov v maternici, čo spätne korelovalo s vnímavosťou maternice. Endometrická tekutina získaná 24 hodín pred prenosom embrya D3 a D5 vykazovalo zvýšené koncentrácie prostaglandín F2 receptoru (PGF2r), čo malo význam pri adhézii embrya. Lipidomika teda slúži ako neinvazívny nástroj, ktorý nám pomáha predpovedať stav receptivity

endometria a bude nepochybne generovať významné údaje v nasledujúcich rokoch (Kovacs, 2019).

5.4 Genomika

Za posledných niekoľko desaťročí pokročila veda od analýzy malého množstva génov k vyšetrovaniu veľkého množstva génov, prechádzajúcich od štúdia dedičných jednotiek k vyšetrovaniu celého genómu organizmu. Veda o genómoch či „genomika“ pôvodne zameraná na stanovenie sekvencie deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) – poradie nukleotidov na danom fragmente DNA, sa rýchlo rozšírila smerom k funkčnejšej úrovni – štúdiu profilov expresie a úloh génov či proteínov (Del Giacco L. et al., 2012).

5.4.1 Genomika embrya

Oocyty sú charakterizované rozdielmi vo vývoji, ktoré sa pripisujú variáciám v mitochondriálnej DNA (mtDNA). Je dokázané, že počty mitochondriálnych kópií oocytov preukazujú vysokú variabilitu medzi rôznymi pacientkami, ako aj variabilitu medzi jednotlivými oocytmi u tej istej pacientky. Počas fetálneho obdobia sa mitochondrie začínajú replikovať a vedú k oogóniám s približne 200 mitochondriálnymi organelami. Mitochondrie pokračujú v replikácii počas dozrievania oocytov, pričom zrelý oocyt v štádiu metafázy II obsahuje okolo 100 000 mitochondrií a 50 000 – 550 000 mtDNA kópií. MtDNA je kruhová dvojláknová molekula s veľkosťou 16,6 kb, ktorá sa nachádza v matrixe mitochondrií a kóduje iba 13 proteínov, ktoré sú súčasťou enzýmových komplexov oxidačnej fosforylácie. Práve kvôli tomu je zrelý oocyt nielen najväčšou bunkou v tele, ale aj najbohatšou bunkou z hľadiska obsahu mtDNA. Mitochondriálna replikácia prebieha v čase implantácie a replikácia mtDNA prebieha po vytvorení blastocysty, pričom jedným z najdôležitejších determinantov pri preimplantácii embrya je prítomnosť mtDNA v oocytoch (Munck et al., 2019).

Prítomnosť veľkého množstva mtDNA kópií v kumulárnych bunkách je silným prediktorom vývoja preimplantačného vývoja, pričom zvýšený fertilizačný potenciál oocytov koreloval s väčším množstvom mtDNA. Predpokladá sa, že počas počiatočných mitotických delení ostáva množstvo mitochondrií v oocytoch stabilné a mtDNA je distribuovaná do výslednej blastoméry. Na druhej strane, sú dokázateľne veľké rozdiely v obsahu mtDNA medzi jednotlivými blastomérmi jedného embrya. V súčasnej dobe nie je možné predpovedať ploiditu embrya v štádiu delenia na základe mtDNA. Dva až tri dni po aktivácii embryonálneho genómu a po vytvorení trofektodermu a embryoblastu sa začne mtDNA replikovať v expandovanej blastocyste, najprv v bunkách trofektodermu a následne v embryoblaste.

Rôzne štúdie poukazujú na fakt, že zvýšené hladiny mtDNA sú spojené so zlyhaním implantácie (Munck et al., 2019). Podľa Diez-Juan (2015) bolo preukázané, že zvýšený počet mtDNA kópií v euploidných embryách naznačuje nižšiu životaschopnosť embryí v rámci preimplantačného potenciálu. U starších pacientiek bol v blastocystách preukázaný vyšší počet mtDNA kópií (Cecchino et al., 2019). Pozorované nezrovnalosti v obsahu mtDNA je možné pripísať viacerým faktorom, ktoré ovplyvňujú vývoj embrya - vek, znížená ovariálna rezerva, stimulačný protokol, BMI či fajčenie, o ktorých je známe, že ovplyvňujú obsah mitochondriálnej DNA v rôznych štádiách vývoja (Munck et al., 2019).

Posledné štúdie uvádzajú, že tekutina blastocelu, izolovaná blastocentézou, obsahuje nukleárnu DNA. Síce jadrová DNA má potenciál podstúpiť komplexnú analýzu chromozómov, stále nie je jasné, do akej miery to má význam pre vývoj embrya (Hammond et al., 2017).

5.4.2 Genomika kultivačného média

V súčasnej dobe sa v reprodukčnej medicíne používajú predimplantačné genetické vyšetrenia, čo vyžaduje použitie invazívnych techník, t.j. biopsia polárneho telieska, blastoméry, trofektodermu či blastocentéza na získanie embryonálnej DNA. V rámci invazívnej analýzy sa robí biopsia embrya v štádiu 8-bunkového embrya odbioptovaním 1-2 blastomér alebo v štádiu blastocysty odbioptovaním 5 – 10 buniek trofektodermu. Aj keď je v súčasnosti biopsia embrya celosvetovo preferovaná, táto metóda má určité obmedzenia:

- biopsia embrya sa môže vykonať iba v určitom štádiu delenia,
- biopsia niekoľkých buniek môže viesť ku geneticky nesprávnej diagnóze – falošne pozitívna/ negatívna, v prípade mozaicizmu embryí,
- invazívne postupy by mohli byť nebezpečné pre reprodukčný potenciál embrya,
- invazívne postupy sú drahé a časovo náročné.

Z toho dôvodu je vysoký záujem štúdií o použité kultivačné médium – spent culture medium (SCM) ako alternatívny zdroj embryonálnej DNA. Zvyšujúci sa počet štúdií uvádza detekciu nebunkovej DNA v SCM a zdôrazňuje diagnostický potenciál neinvazívneho preimplantačného genetického vyšetrenia na báze SCM k hodnoteniu genetického stavu ľudského embrya získaného v procese IVF (Brouillet et al., 2020). Ako najlepšia voľba pre neinvazívne PGD sa javí detekcia voľnej DNA (cf-DNA). Detekcia jadrovej DNA a mitochondriálnej DNA v SCM ľudských embryách počas IVF otvára možnosti pomocou tejto neinvazívnej techniky na vyvinutie nového prístupu PGD. Mnohé štúdie detegovali cf-DNA

v SCM a vyhodnotili potenciál genetického profilu vyvíjajúcich sa embryí. Cf-DNA sa však nezistila v SCM v štádiu zygoty. Bolo tiež preukázané, že väčšie množstvo DNA je u embryí s nepravidelným delením v porovnaní s vysoko kvalitnými embryami v použítom médiu spojený s úspešným výsledkom implantácie (Yang et al., 2017). Malé množstvo jadrovej DNA s porovnateľne vyšším množstvom mtDNA boli detegované v použítom kultivačnom médiu (Hammond, 2017). V tejto súvislosti môže obsah DNA v SCM v kombinácii s morfológickou známkou predvídať potenciál blastocysty a výsledok implantácie. Yang et al., (2017) preskúmali prítomnosť genomickej DNA amplifikáciou génov SRY na chromozóme Y, určujúcich pohlavie od 1. – 6. dňa v SCM pomocou PCR analýzy. Gén SRY sa úspešne amplifikoval v deň 3. – 6. v SCM, kde bol amplifikovaný 189 bp produkt. Žiaden signál nebol detegovaný medzi 1. a 2. dňom v SCM. To poukazuje na to, že kultivačné médium obsahuje DNA fragmenty, pochádzajúce z moruly alebo blastocysty a poskytuje možnosť skríningu génových profilov detekciou SCM (Yang et al., 2017). Stigliani et al., 2013 potvrdili prítomnosť DNA v kultivačnom médiu embrya a demonštrovali, že gDNA a mtDNA sú detekovateľné v sekretóme. Väčšie množstvo DNA je u embryí s nepravidelným delením v porovnaní s vysokokvalitnými embryami, čo naznačuje, že profil DNA v kultivačnom médiu je objektívnym znakom hodnotenia kvality embrya.

Profily DNA sú významne spojené s fragmentačnou vlastnosťou a pokročilým vekom pacientky. Fragmentácia je spoločným znakom oplodnených embryí *in vitro*. Fragment je definovaný ako extracelulárna membránovo viazaná cytoplazmatická štruktúra, ktorá má u dvojdnového embrya priemer < 45 μ m a u trojdnového embrya < 40 μ m. Pomocou TimeLapse systému je viditeľné, že k fragmentácii dochádza častokrát už od prvého mitotického delenia. Fragmenty sa môžu vyskytovať v miernom stupni fragmentácie alebo rozsiahle fragmenty zahŕňajúce celé blastoméry, čo spôsobuje znížený počet buniek a ich dezorganizáciu. Rozsiahla fragmentácia je spojená s genetickými abnormalitami ako napríklad aneuploidita či mozaika embrya. Stigliani et al., (2013) v rámci svojej štúdie potvrdili, že koncentrácie DNA v kultivačnom médiu boli významne spojené s rozsahom fragmentácie. Kultivačné médium z fragmentovaných embryí malo vyšší obsah dsDNA a mtDNA ako embryá s miernym stupňom fragmentácie (5 %) (Stigliani et al., 2013).

5.5 Transkriptomika

Použitie transkriptomikkej analýzy v reprodukčnej medicíne by mohlo zlepšiť pochopenie dôležitých fyziologických procesov alebo objavenie genetických biomarkerov

kvality oocytov a embryí, ako aj a vnímavosti endometria. Najbežnejší prístup ku skúmaniu génovej expresie spočíva v kombinácii analýzy microarray s následnou kvantitatívnou real-time PCR. Technológia DNA microarray je nástrojom na stanovenie expresie génov v celom genóme na úrovni mediátorovej RNA (mRNA) a poskytuje zoznam potenciálne odlišne exprimovaných génov. Presná kontrola génovej expresie počas preimplantačného embryonálneho vývoja má osobitný význam. V štádiu prvej diferenciácie buniek prestáva byť embryo závislé na zdedených materských transkriptoch a začína sa expresia génov embrya (Sills, 2015).

5.5.1 Mediátorová/ messenger RNA

Mediátorová/ messenger RNA je jednovláknová ribonukleová kyselina (RNA), ktorá je komplementárna k jednému z reťazcov DNA génu. mRNA je typom RNA, ktorá opúšťa bunkové jadro a prechádza do cytoplazmy, kde dochádza k tvorbe proteínov. Počas syntézy proteínov sa ribozóm pohybuje pozdĺž mRNA, číta sekvenciu báz a pomocou genetického kódu preloží každý triplet (kodón) do odpovedajúcej aminokyseliny (<https://www.genome.gov/genetics-glossary/messenger-rna>).

Génová expresia má zásadnú úlohu pri koordinácii homeostatických a metabolických mechanizmov počas celého života. Precízna kontrola génovej expresie počas preimplantácie je obzvlášť dôležitá vo fáze vývoja ako:

- čas prvého delenia,
- aktivácia embryonálneho genómu,
- kompaktácia v štádiu moruly,
- tvorba blastocysty s diferenciáciou na trofektoderm a embryoblast (Corcoran et al., 2005).

Biase et al., (2014) mali hypotézu, že zásoba mRNA v oocytoch je spojená s vývojom embrya až do štádia blastocysty. Na základe tejto hypotézy analyzovali transkriptóm oocytu, cieľom ktorého bolo identifikovať gény exprimované v oocyte, ktoré korelujú s jeho schopnosťou vyvinúť sa do štádia blastocysty. Frakcia cytoplazmy oocytov bola podrobená biopsii pomocou mikroaspirácie a uchovaná k ďalšej analýze expresie. Oocyty boli chemicky aktivované, kultivované individuálne a klasifikované podľa ich schopnosti vyvíjať sa *in vitro* do štádia blastocysty. Analýza mikročipov prebiehala na mRNA extrahovanej z frakcií cytoplazmy oocytov, pričom korelovala so schopnosťou vyvinúť sa do štádia blastocysty –

kvalitný oocyt, alebo sa zastavilo v 8 – 16-bunkovom štádiu – nekvalitný oocyt. Expresia 4320 hodnotených génov bola detegovaná vo frakciách cytoplazmy, ktoré boli aspirované z oocytov zrejúcich *in vitro*. Klasifikácia génovej ontológie odhalila, že génová expresia bola spojená s určitými biologickými procesmi ako spracovanie RNA, translácia a metabolický proces mRNA. V oocytoch sa nachádzali gény, ktoré sú dôležité pre molekulárne funkcie RNA väzby a aktivity translačného faktora. Bolo identifikovaných 29 génov s odlišnou expresiou medzi dvoma porovnávanými skupinami oocytov – dobrá a zlá kvalita. Obsah mRNA exprimovaný v oocytoch v štádiu metafázy II ovplyvňuje aktiváciu embryonálneho genómu a umožňuje ďalší vývoj do štádia blastocysty (Biase et al., 2014). Nástupom RT-PCR sa naskytila príležitosť pre analýzu génovej exprese embryí počas ich vývoja (Rappolee et al., 1988).

Súčasnú štúdiu poukazujú, že *in vitro* kultivácia mení expresiu mRNA jednotlivých embryí v priebehu raného vývoja. Rôzne kultivačné médiá *in vitro* vedú k odlišnému profilu génovej exprese v blastocystách, čo vedie k narušenému skorému vývoju. Možné dôsledky *in vitro* kultivácie sa týkajú modifikovaného modelu exprese mRNA a mali by poukázať na dlhodobé klinické aspekty a zdravotný stav detí narodených po IVF (Pfeifer et al., 2012).

Okrem použitého kultivačného média môžu génovú expresiu ovplyvniť aj samotné podmienky kultivácie. Embryá reagujú na zmeny koncentrácie kyslíka zmenou exprese glukózového transportéra-1 (Concoran et al., 2005). Blastocysty so zvýšeným množstvom mRNA je možné vysvetliť adaptívnym mechanizmom embrya z možného stresu v modifikovanej kultivácii v porovnaní s fyziologickými podmienkami v ženskom reprodukčnom trakte (Pfeifer et al., 2012).

5.5.2 Malé nekódujúce RNA a dlhé nekódujúce RNA

Pôvodná „RNA rodina“ pozostáva z 3 hlavných členov – transferová RNA (tRNA), ribozomálna RNA (rRNA) a messenger RNA (mRNA). Tieto malé nekódujúce RNA boli identifikované ako dôležité negatívne regulátory vo vývoji a v procesoch dospelých buniek zahŕňajúcich génovú expresiu. Pokročilá genomická analýza odhalila dlhý zoznam nekódujúcich RNA (ncRNA), ktoré majú rôzne úlohy v signalizácii, spracovaní proteínov a diferenciácii a sú funkčne dôležité na transkripčnej a posttranskripčnej úrovni pre rôzne bunkové procesy, čo môže umožniť pohľad na možné príčiny zlyhania implantácie embrya po IVF (Hossain et al., 2012, Timofeeva et al., 2019).

Medzi nekódujúce RNA patrí:

- malá nukleárna RNA (snRNA),
- malá nukleolárna RNA (snoRNA),
- krátka regulačná RNA (piwi-interagujúca RNA – piRNA),
- endogénna malá interferujúca RNA (endo-siRNA),
- mikro RNA (miRNA) (Svoboda, 2017),
- dlhá nekódujúca RNA (lncRNA) – trieda RNA dlhšia ako 200 bp, ktorá nekóduje bielkovinový produkt.

Spomedzi sncRNA má veľký význam miRNA, malé endo siRNA a piRNA. Mikro RNA sú malé (približne 22 nukleotidov) nekódujúce RNA, ktoré regulujú génovú expresiu (Rosenbluth et al., 2014). MiRNA sa syntetizujú v granulóznych a kumulárnych bunkách a vylučujú sa do folikulárnej tekutiny (Timoteeva et al., 2019). Prítomnosť a expresia miRNA a génov na spracovanie mechanizmov miRNA v oocytoch a preimplantačných embryách preukázala zapojenie miRNA do rastu a dozrievania oocytov cicavcov, skorý embryonálny vývoj, diferenciáciu a implantáciu línie kmeňových buniek. Molekuly miRNA sú zabalené do malých vezikúl, nazývané exozómy a následne vylučované do extracelulárneho priestoru. Zapuzdrené miRNA sú chránené pred degradáciou, a môžu byť detekované aj po dlhšej dobe (Hossain et al., 2012).

Biogenéza piRNA je v porovnaní s miRNA a siRNA menej skúmaná. Podľa údajov sekvenovania novej generácie existuje niekoľko tried piRNA (Houwing et al., 2007). piRNA I. triedy sú produkované zoskupením genetických lokusov. Dochádza k štiepeniu cieľovej skupiny transpozónu RNA, sprostredkované piwi proteínom piRNA II. triedy. Posledná skupina piRNA pochádza z rôznych genómových oblastí, ktoré zahŕňajú tri primárne nepreložené oblasti niektorých mRNA. To poukazuje na to, že piRNA môžu regulovať úroveň genómovej expresie okrem udržania chromozomálneho prešmyku potlačením transponovateľného prvku. Model amplifikácie piRNA a neutralizácia transpozónov sa vyskytujú prostredníctvom ping-pongového mechanizmu v zárodočných bunkách. Bolo preukázané, že miRNA, piRNA a siRNA sú nevyhnutné pri aktivácii genómu embrya (Timofeeva, 2019).

Malá interferujúca nekódujúca RNA (siRNA) patrí do triedy dvojvláknových RNA, dlhá 20-27 nukleotidov, podobná miRNA, ktorá pôsobí v rámci interferencie RNA dráhy. Zasahuje do expresie špecifických génov s komplementárnymi nukleotidovými sekvenciami degradáciou mRNA po transkripcii a zabraňuje translácii. siRNA je komplexom mechanizmov, ktoré regulujú génovú expresiu prostredníctvom malých molekúl RNA (Laganà et al., 2015).

Dlhá nekódujúca RNA nekóduje proteíny dlhšie než 200 nukleotidov, a predstavuje veľkú a rôznorodú triedu nekódujúcej RNA (Zhong et al., 2018). Ich biogénéza je podobná mRNA, vrátane kontroly transkripcie a posttranskripčného spracovania. Keďže niektoré lncRNA slúžia ako prekursori pre malé nekódujúce regulačné RNA v tlmiacich dráhach RNA, obidva typy nekódujúcej RNA sa skúmajú spoločne (Svoboda, 2017). Pokroky v sekvenácii RNA a výpočtovej technológii umožnili bezprecedentnú analýzu týchto transkriptov. Analýzy genómu identifikovali viac ako 9000 ľudských dlhých intergénnych nekódujúcich RNA (lincRNA). Jia-jun Qiu et al., (2016) identifikovali 421 nových lncRNA v štúdií na stanovenie expresie úroveň všetkých génov v ľudských embryách v počiatocnom štádiu, pričom sú exprimované vo vývojovom štádiu a môžu regulovať génovú transkripciu v *cis* forme v ľudskom embryu (Jia-jun Qiu et al., 2016).

Aktivácia genómu je vývojovým obdobím, v ktorom sa degraduje materská mRNA a aktivuje sa embryonálna transkripcia. Prestavba chromatinu, obklopujúceho nukleozómy, vrátane repozície nukleozómov a posttranslačnej modifikácie histónov sa zhoduje s aktiváciou embryonálneho genómu a vedie k expozícii počiatocných miest transkripcie génov zygoty. V štúdií bolo preukázané, že lncRNA môžu regulovať remodeláciu chromatinu, nábor RNA polymerázy II a stimulovať aktiváciu genómu reguláciou zhromažďovania nukleozómov (Jia-jun Qiu et al., 2016).

Nekódujúce RNA a embryo

Prechod oocyty do embrya je proces, počas ktorého je oocyt oplodnený a stáva sa z neho vyvíjajúce embryo. Zahŕňa prvé veľké preprogramovania genómu v živote organizmu, kde sa remodeluje génová expresia, ktorá vedie k diferenciácii oocytov, aby sa stanovila totipotencia v blastomérach skorého embrya. Táto remodelácia zahŕňa degradáciu materskej RNA a aktiváciu genómu zygoty (Svoboda, 2017).

Analýza lncRNA a proteín-kódujúcich mRNA ukazujú, že lncRNA sú prítomné od začiatku vývoja ľudských embryí a stávajú sa dominantnou kategóriou transkriptov po aktivácii

embryonálneho genómu. Keďže sú lncRNA detegované počas skorého embryonálneho vývoja, mohli by predstavovať kandidátske markery aktivácie embryonálneho genómu. Dlhé nekódujúce RNA sú súčasťou dynamických zmien v expresii transkriptómu, ktoré sa vyskytujú počas vývoja ľudského embrya, a ktoré prispievajú k dramatickým morfológickým zmenám počas vývoja (Bouckenheimer et al., 2016).

Nekódujúce RNA v kultivačnom médiu

V nedávnej dobe bol navrhnutý nový prístup k neinvazívnemu skríningu použitého média, v ktorom prebiehala kultivácia embrya. Zahŕňa detekciu miRNA priamo v médiu použitého pri kultivácii embryí. Malé nekódujúce RNA, napr. miRNA je dôležitá pre embryogenézu a vývoj. Prítomnosť miRNA bola detegovaná takmer vo všetkých telových tekutinách vrátane slz, krvi, moču, materského mlieka a ejakuláte či v médiu na kultiváciu buniek. Extracelulárna miRNA je veľmi stabilná a odolná voči degradácii. V použítom kultivačnom médiu sú prítomné látky, ktoré možno rozdeliť do 3 hlavných skupín:

- preložené proteíny zo špecifických produktov génovej expzie buniek (proteomika),
- konečné produkty biologických procesov buniek (metabolomika),
- negatívne regulátory génovej expzie na báze RNA (ncRNA), ktoré sa preukázali ako extracelulárne stabilné (Rødgaard et al., 2015).

Analýza týchto molekúl je náročná, pretože sa v kultivačnom médiu nachádzajú v obmedzenom množstve, a preto sú tieto metódy vysoko citlivé. Celkový objem kultivačného média predstavuje približne 25 μ l na jedno embryo, resp. 400 – 500 μ l pri skupinovej kultivácii. Identifikácia miRNA sa výrazne zvýšila, čo viedlo k dvom štúdiám, publikovaných v roku 2014, ktoré tvrdia, že embryá skutočne vylučujú miRNA do kultivačného média, a že profil miRNA by sa mohol použiť ako biomarker na predpovedanie úspešnosti prenosu embrya (Rødgaard et al., 2015). Rosenbluth et al. (2014) študovali 754 ľudských miRNA a zistili, že miR-372, miR-191 a miR-645 sa exprimovali rozdielne 5. deň medzi SCM, ktoré mali úspešné výsledky tehotenstva a SCM, ktoré nevedli k tehotenstvu. Zistilo sa aj to, že miR-191 sa vyskytovala vo vyšších koncentráciách v SCM aneuploidných embryí v porovnaní s euploidným embryom. Z viacerých vzoriek sa zistilo, že miR-645 je nedetekovateľná v médiách z niekoľkých zdravých embryí a vyššie hladiny expzie miR-645 korelovali s negatívnym výsledkom tehotenstva (Rosenbluth et al., 2014).

Analýza mikroRNA z SCM predstavuje neinvazívny spôsob odlíšenia životaschopných a neživotaschopných embryí. Všeobecný záujem o detekciu miRNA ako biomarkera životaschopnosti embryí rýchlo rastie a urýchľuje tak vývoj nových a citlivejších metód detekcie miRNA. Kvantitatívna polymerázova reťazová reakcia (qPCR) je rýchla, relatívne lacná analýza a môže byť použitá aj v prípade malých množstiev analyzovanej vzorky (Rødgaard et al., 2015).

6 Záver

Selekcia vhodného embrya na embryotransfer je v súčasnej dobe jeden z limitujúcich krokov v procese *in vitro* fertilizácie. Time-lapse monitoring či preimplatačná genetická diagnostika, považovaná za invazívnu analýzu, neprinášajú očakávané výsledky, a implantačný potenciál transferovaných embryí nedosahuje 30 %. Štúdium kultivačných médií embryí sa v súčasnosti javí ako perspektívny ukazovateľ potenciálu embryí.

Predložená bakalárska práca sumarizovala úlohu a využitie nukleových kyselín v rámci molekulových a reprodukčných techník v IVF procese. Práca poukázala na publikované rozdiely v obsahu mtDNA medzi jednotlivými blastomérmi jedného embrya, pričom zvýšený počet mtDNA kópií bol preukázaný u aneuploidných embryí, ktoré generujú staršie pacientky v súvislosti s ovariálnou rezervou pacientky, BMI, stimulačným protokolom či fajčením. Rovnako sa venovala profilu DNA a nekódujúcich RNA v použítom kultivačnom médiu ako objektívnemu znaku hodnotenia kvality embryí, po ich secernácií.

Práca preukázala, že hodnotenie kvality embryí pomocou neinvazívnych techník má veľkú perspektívu v budúcnosti pri výbere viabilného a kvalitného embrya, jeho následného úspešného IVF procesu a predídania samotného implantačného zlyhania.

7 Zoznam skratiek

ApoA1	apolipoproteín A1
ATP	adenozíntrifosfát
BMI	Body Mass Index
CGH	komparatívna genómová hybridizácia
CO ₂	oxid uhličitý
CXCL13	chemokínový ligand 13
DNA	deoxyribonukleová kyselina
endo-siRNA	endogénna krátko interferujúca ribonukleová kyselina
EDTA	etyléndiamintetraoctová kyselina
gDNA	genomická deoxyribonukleová kyselina
GM-CSF	granulocytárny makofágokolónový - stimulujúci faktor
GV	germinatívna vezikula
HDL	lipoproteín s vysokou hustotou
HSA	ľudský sérový albumín
ICSI	intracytoplazmatická injekcia spermie
IL-6	interleukín-6
IMSI	intracytoplazmatická morfológická selekcia spermíí
IVF	in vitro fertilizácia
lcrRNA	dlhá kódujúca ribonukleová kyselina
lincRNA	dlhá intergénna nekódujúca ribonukleová kyselina
MACS	magneticky aktivovaná selekcia spermíí
MI	metafáza I
MII	metafáza II

mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
miRNA	mikro ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriálna deoxyribonukleová kyselina
MSS	mikrofluidný čip
NIR	blízkej infračervenej spektroskopie
PICSI	preselektovaná intracytoplazmatická injekcia spermie
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PGD	preimplatačné genetické vyšetrenie
PGF2r	prostaglandín F2 receptor
piRNA	krátka regulačná piwi ribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
SCM	použité kultivačné médium
snRNA	malá nukleárna ribonukleová kyselina
snoRNA	malá nukleolárna ribonukleová kyselina
SRY	oblasť chromozómu Y zodpovedajúca za pohlavie

8 Zoznam ilustrácií

Obrázok 1 Oocyt v štádiu metafáza II (MII)	10
Obrázok 2 Oocyt v štádiu metafáza I (MI)	11
Obrázok 3 Oocyt v štádiu germinatívnej vezikuly (GV).....	11
Obrázok 4 Pronukleárne štádium – dve prvojadrá	13
Obrázok 5 Early cleavage štádium – dvojbunkové štádium.....	14
Obrázok 6 Embryo v štvorbunkovom štádiu	14
Obrázok 7 Embryo v osembunkovom štádiu.....	14
Obrázok 8 Štádium kompaktovanej moruly	15
Obrázok 9 Štádium expandovanej blastocysty	15

9 Literatúra

BIASE, FH., EVERTS, RE., OLIVEIRA, R., et al. „Messenger RNA in Metaphase II Oocytes Correlate with Successful Embryo Development to the Blastocyst Stage.“ *Zygote*, 2014, vol. 22, no. 1, p. 69-79.

BLERKOM, J., GREGORY, L.: *Essential IVF: Basic Research and Clinical Applications*. Springer Science & Business Media, 2004, 628 p. ISBN 1-4020-7551-0.

BOONE, WR., JOHNSON, JE., SPEIZER, FE., DOCKERY, DW. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory, *Fertility and Sterility*, January 1999, vol. 71, iss. 1, p. 150-154.

BOUCKENHEIMER, J., ASSOU, S., RIQUIER, S., HOU, C., et al. Long non-coding RNAs in human early embryonic development and their potential in ART. *In Human Reproduction Update*, 2016, vol. 23, iss. 1, p. 19–40.

BROUILLET, S., MARTINEZ, G., COUTTON, Ch., HAMAMAH, S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*, 2020, vol. 40, iss. 6, p. 779-796.

CECCHINO, GN., GARCIA-VELASCO, JA. Mitochondrial DNA copy number as a predictor of embryo viability. *Fertility and sterility*, 2019, vol. 111, no. 2, p. 205–211.

CONAGHAN, J., HANDYSIDE, A., WINSTON, R. et al. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil*, 1993, vol. 99, p. 87-95.

CORCORAN, D., FAIR, T., LONERGAN, P. Predicting embryo quality: mRNA expression and the preimplantation embryo. *Reproductive BioMedicine Online*, 2005, vol. 11, no. 3, p. 340-348.

DALE B., MENEZO Y., COHEN J., DiMATTEO L., WILDING M.: Intracellular pH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod.*, 1998, vol. 13, p. 964-970.

DEL GIACCO, L., CATTANEO, C. Introduction to Genomics. *In: Espina V., Liotta L. (eds) Molecular Profiling. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2012, vol. 823, p. 79-88.

DIEZ-JUAN, A., RUBIO, C., MARIN, C., et al. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertility and Sterility*, 2015, vol. 104, iss. 3, p. 534-541.

DOMINGUEZ, F., GADEA, B., MERCADER, A., et al. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertility and Sterility*, February 2010, vol. 93, iss. 3, p. 774-782.

DOMINGUEZ, F., MESEGUER, M., APARICIO-RUIZ, B., et al. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertility and Sterility*, October 2015, vol. 104, iss. 4, p. 908-914.

GARDNER, D. K., et al, *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. vol 1: Laboratory Perspectives, Fourth Edition. Informa Healthcare. 2012, 421 p. ISBN 978-1-84184-970-6.

GARDNER, DK., HAMILTON, R., McCALLIE, B., et al. Human and mouse embryonic development, metabolism and gene expression are altered by an ammonium gradient in vitro reproduction. *Society for Reproduction and Fertility*, 2013, vol. 146, iss. 1, p. 49-61.

HAMMOND, ER., MCGILLIVRAY, BC., WICKER, SM., et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and Sterility*, 2017, vol. 107, iss. 1, p. 0015-0282.

HARPER, JC. & HARTON, G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility*, September 2010, vol. 94, no. 4, p. 1173-1177.

HENTEMANN, M., MOUSAVI, K., and BERTHEUSSEN, K. Differential pH in embryo culture. *Fertility and Sterility*, March 2011, vol. 95, no. 4, p. 1291-1294.

HORCAJADAS José A., Jaime Gosálvez: *Reproductomics: The -Omics Revolution and Its Impact on Human Reproductive Medicine*. Academic Press, 2018, 425 p. ISBN 978-0-12-812571-7.

HOSSAIN, MM., SALILEW-WONDIM, D., SCHELLANDER, K., TESFAYE, D. The role of microRNAs in mammalian oocytes and embryos. *Anim Reprod Sci.*, 2012 Sep, vol. 134, no. 1-2, p. 36-44.

HOUWING, S., KAMMINGA, LM., BEREZIKOV, E., et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *In Cell.* 2007, vol. 129, p. 69–82.

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/messenger-rna>

KATZ-JAFFE, MG. and GARDNER, DK.: Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology*, 2007, vol. 68, no. 1, p. 125-130.

KHOUDJA, RY., XU LT., ZHOU, C.: Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2013, vol: 30, no. 1, p. 69-76.

KIRKEGAARD, K., AHLSTROM, A., INGERSLEV, HJ., et al. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertility and Sterility*, February 2015, vol. 103, no. 2, February 2015, p. 323-332.

KOVACS, G., RUTHERFORD, A., GARDNER, DK.: How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success. Cambridge University Press, 2019, 398 p. ISBN 978-1-316-62177-6.

LAGANA, A., VENEZIANO, D., RUSSO, F., et al. Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. *Methods Mol Biol*, 2015, vol. 1269, p. 393-412.

MAINS, LM., CHRISTENSON, L., YANG, B., et al. Identification of apolipoprotein A1 in the human embryonic secretome. *Fertility and Sterility*, August 2011, vol. 96, no. 2, p. 422-427.

MORBECK, DE., KHAN, Z., BARNIDGE, DR., WALKER, DL. Washing mineral oil reduces contaminants and embryotoxicity. *Fertil Steril*, 2010, vol. 94, p. 2747 –2752.

MUNCK, N., LIÑÁN, A., ELKHATIB, I., et al. mtDNA dynamics between cleavage-stage embryos and blastocysts. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2019, vol. 36, p. 1867–1875.

NAGY ZP, SAKKAS D., BEHR B. Symposium: Innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reproductive BioMedicine Online*, 2008, vol. 17, No 4, p. 502-507.

PFEIFER, N., BASTON-BUST, DM., HIRCHENHAIN, J., et al. „Selection of the *In Vitro* Culture Media Influences mRNA Expression of Hedgehog Genes, *II-6*, and Important Genes regarding Reactive Oxygen Species in Single Murine. 2012, *The Scientific World Journal*, vol. 2012, p. 7-9.

QIANSHENG, Z., SIERRA, ET., MALMSTEN, J., et al. Blastocyst score, a blastocyst quality ranking tool, is a predictor of blastocyst ploidy and implantation potential. *Fertil Steril Rep*, September 2020, vol. 1, no. 2, p. 2666-3341.

QIU, JJ., REN, ZR., YAN, JB. Identification and functional analysis of long non-coding RNAs in human and mouse early embryos based on single-cell transcriptome data. *In Oncotarget*, 2006, vol. 7, no. 38, p. 61215–61228.

QUINN P.: Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART. Cambridge University Press, 2014. 296 p. ISBN 978-1-107-61953-1.

RAPPOLEE DA., BRENNER CA., SCHULTZ, R., et al. Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science*, 1988, vol. 241, p. 1823–1825.

REED, ML., HAMIC, A., THOMPSON, DJ., et al. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertility and Sterility*, November 2009, vol. 92, iss. 5. p. 1783–1786.

RIENZI, L., UBALDI, FM., IACOBELLI, M., et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility*, November 2008, vol. 90, no. 5, p. 1692-1670.

RØDGAARD, T., HEEGAARD, P., CALLESEN, H. Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. *Reproductive BioMedicine Online*, 2015, vol. 31, p. 585–592.

ROSENBLUTH, EM., SHELTON, DN., WELLS, LM., et al. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertility and Sterility*, May 2014, vol. 101, no. 5, p. 1493-1500.

SILLS E.S.: Screening the Single Euploid Embryo: Molecular Genetics in Reproductive Medicine. Springer, 2015. p. 393. ISBN 978-3-319-16891-3.

STIGLIANI, S., ANSERINI, P., VENTURINI, PL., SCARUFFI, P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum Reprod.*, 2013, vol. 28, no. 10, p. 2652-2660.

SVOBODA P.: Long and small noncoding RNAs during oocyte-to-embryo transition in mammals. *Biochem Soc Trans*, 2017 October 15, vol. 45, no. 5, p. 1117-1124.

TAO, J., TAMIS, R., FINK, K., et al. The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum Reprod*, 2002, vol. 17, p. 1513–1518.

TELFORD, NA., WATSON, AJ., SCHULTZ, GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 1990, vol. 26, p. 90–100.

THOMPSON JG., SIMPSON AC., PUGH PA., TERVIT HR. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *In Mol Reprod Dev*, 1992, vol. 31, iss. 4, p. 253-257.

TIMOFEEVA AV., CHAGOVETS, VV., DRAPKINA, YS., et al. Cell-Free, Embryo-Specific snRNA as a Molecular Biological Bridge between Patient Fertility and IVF Efficiency. *In Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 2912, p. 2-3.

TOPORCEROVÁ S. a kol., Základy reprodukčnej medicíny. BEKI Design. 2015, 406 s. ISBN 978-80-89522-04-0.

TRÁVNÍK P., Klinická embryologie. Mladá fronta a. s., 2018, 501 s. ISBN 978-80-204-4940-5.

TYLER, J. et al.: Back to basics: a plea for a fundamental reappraisal of the representation of acidity and basicity in biological solutions. In Regulation of Acid-base Status in Animals and Plants. Ed. Cambridge University Press, 1999. 392 p. ISBN 9780521623179.

VILELLA F., RAMIREZ LB., SIMON C. Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertil Steril*, 2013, vol. 99, p. 1100-1106.

WHO. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Cambridge, UK. Cambridge University Press, Fifth Edition. 2010. ISBN 978-92-4-154778-9.

YANG, L., LV, Q., CHEN, W., et al. Presence of embryonic DNA in culture medium. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, p. 67805-67809. Online ISSN: 1949-2553.

ZHONG, L., MU, H., WEN, B., et al. Long non-coding RNAs involved in the regulatory network during porcine pre-implantation embryonic development and iPSC induction. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 6649.