

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Nové metody výběru nejlepšího embrya k transferu
s cílem zvýšit úspěšnost otěhotnění v programu IVF**

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Konzultant: Prim. MUDr. Jiří Štěpán, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

Lucie Hejhalová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení .

Dále chci poděkovat prim. Mudr. Jiřímu Štěpánovi, CSc. za laskavé svolení prezentovat výsledky centra asistované reprodukce Sanus Pardubice, RNDr. Radku Hamplovi, PhD. a celému kolektivu pracujícím v tomto centru.

Další poděkování patří mému manželovi a přátelům za podporu a pomoc během studia.

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 28.4.2014

Abstrakt

Tato práce představuje současné metody sloužící k výběru nejkvalitnějších embryí s největším potenciálem k úspěšné implantaci. V dnešní době se preferuje transfer jednoho embrya a tudíž se metody výběru zdokonalují a hledají se nejvhodnější parametry pro výběr. Kvalita embryí může být posuzována mnoha metodami. Nejstarší a nejpoužívanější je klasické morfologické hodnocení. Další způsob hodnocení je na základě metabolické aktivity embrya při kultivaci, nevýhodou je nákladnost metody. Genetická vyšetření, jako preimplantační genetická diagnostika a preimplantační genetický screening, jsou také nákladnější a invazivní, tudíž hrozí poškození embrya a vzhledem k mozaicismu také není 100% účinná. Skloubení morfologického a kinetického hodnocení nabízí neinvazivní metoda time-lapse monitoringu. Embrya se hodnotí podle morfologických znaků a také na základě načasování rýhování a synchronie dělení.

Cílem práce je porovnat ze statistických výsledků centra asistované reprodukce Sanus Pardubice, jestli morfokinetická metoda (PrimoVision, Cryo-Innovation, Maďarsko) zlepšit úspěšnost v programu in vitro fertilizace oproti klasické morfologické metodě hodnocení kvality embryí za první dva roky používání tohoto systému. Celek se rozdělil na 2 skupiny, s použitím PrimoVisionu a s klasickým hodnocením vývoje. A tyto skupiny se ještě rozdělily podle věku na ≤ 30 let, 31-35 roků, ≥ 36 let. U výsledků celkem nebyl nalezen rozdíl v pregnancy rate s použitím a bez použití PrimoVisionu. Při rozdělení klientek podle věku byly výsledky pregnancy rate nižší s PrimoVisionem u klientek ≤ 30 let a 31-35 let. U těchto skupin metoda time-lapse nepřispěla k lepším výsledkům než klasické hodnocení vývoje embryí. Užitečnost systému time-lapse se projevila u klientek ve skupině ≥ 36 let, kde byly výsledky lepší s time-lapse monitoringem než bez něj.

Klíčová slova: lidské embryo, time-lapse monitoring PrimoVision, asistovaná reprodukce, rýhování buněk

Abstract

This paper presents the methods for selecting the best quality embryos with the greatest potential for successful implantation. Today, it is preferable to transfer one embryo and therefore selection methods are continually improving and we are looking for the most suitable parameters for selection. Embryo quality can be judged from many methods. The oldest and most widely used is the classic morphological rating. Another evaluation method is based on the metabolic activity of the embryo during the cultivation, the disadvantage of this method is the cost. Genetic testing as preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening are also costly and invasive, therefore may damage the embryo and due to mosaicism, also is not 100% effective. Combining morphological and kinetic evaluation provides a non-invasive method of time-lapse monitoring. Embryos are assessed by morphological characters and also on the timing and synchrony cleavage.

The aim of the study is to compare the statistical results of car Sanus Pardubice, if morphokinetic method (PrimoVision, Cryo-Innovation, Hungary) help improve the IVF results compared to the classic morphological method of assessing the quality of embryos for two years using the system. The unit is divided into 2 groups with and without PrimoVision and these are more selected according the age ≤ 30 years, 31-35 years, ≥ 36 years. In the results there were no difference in this groups. In a distribution of clients by the age, the pregnancy rate results were lower with PrimoVision for clients ≤ 30 years and 31-35 years. In these groups, the method time-lapse didn't contribute to better results than classic rating of embryo development. The usefulness of time-lapse occurred in the group ≥ 36 years, where the results were better with time-lapse monitoring than without it.

Keywords : human embryo, Time -lapse monitoring PrimoVision, assisted reproduction, cleavage cells

1. Obsah

2.	Použité zkratky	8
3.	Úvod	10
4.	Zadání bakalářské práce-cíl práce	11
5.	Od stimulace k transferu	12
5.1	Stimulace vaječnicků.....	12
5.2	Aspirace oocytů.....	13
5.3	Příprava spermií	13
5.4	Metody oplození	14
5.4.1	In vitro fertilizace- klasická metoda	14
5.4.2	Mikromanipulační metody.....	14
5.5	Kultivace embryí.....	17
5.5.1	Den 0	17
5.5.2	Den 1	17
5.5.3	Den 2 a 3	18
5.5.4	Den 4 a 5	18
5.6	Transfer embryí.....	19
6.	Metody hodnocení pro selekci zygot a embryí	21
6.1	Klasická morfologická hodnocení.....	21
6.1.1	Hodnocení kvality zygot	21
6.1.2	Hodnocení kvality embryí	22
6.2	Hodnocení kvality na základě metabolomiky a proteomiky	22
6.3	PGD a PGS	23
6.4	TIME-LAPSE MONITORING	24
6.4.1	Eeva	25
6.4.2	Embryoscope.....	25
6.4.3	Primovision.....	26
7.	Experimentální část.....	27
7.1	Metodika a materiál.....	27
7.2	Charakteristika souboru.....	27

8. Výsledky.....	28
9. Diskuze	32
10. Závěr.....	33
11. Přílohy.....	34
12. Seznam obrázků a tabulek a grafů	35
13. Použitá literatura.....	36

2. Použité zkratky

CAR	Centrum Asistované Reprodukce
EC	Early Cleavage embryo (22-26 hodin po inseminaci již proběhlo první buněčné dělení)
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization , metoda fluorescenční in situ hybridizace
hCG	Human Chorionic Gonadotropin , lidský choriový gonadotropin
HLA-G	Lidský leukocytární antigen
ICSI	IntraCytoplasmic Sperm Injection , vpich jedné spermie do oocytu
IMSI	Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection , výběr nejvhodnější spermie k oplození oocytu dle její morfologie
IVF a ET	In Vitro Fertilization a Embryo Transfer , oplození oocytu mimo tělo ženy a přenos vzniklého embrya do dělohy
MESA	Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration , spermie získané aspirací z nadvarlete
PCR	Polymerase Chain Reaction , polymerázová řetězová reakce
PCOS	Syndrom polycystických vaječníků - endokrinní porucha zrání a uvolňování vajíček
PGD	Preimplantační Genetická Diagnostika embrya
PGS	Preimplantační Genetický Screening embrya
PICSI	Preselected IntraCytoplasmic Sperm Injection , výběr zralé spermie pro oplodnění oocytu
PN	ProNuclear , prvojádro vzniklé bezprostředně po oplození
PNB	ProNuclear Bodies , jádérka v prvojádru

PR	Pregnancy Rate , vyjadřuje v procentech počet získaných těhotenství na embryotransfer
PT	Polové Tělísko
PV	PrimoVision
TESE	TEsticular Sperm Extraction , spermie získané extrakcí z tkáně varlete

3. Úvod

Neschopnost počít nebo donosit dítě je celosvětovým problémem zejména ve vyspělých zemích včetně České republiky. Za neplodné se považují páry, které nemohou počít dítě po jednom roce snahy při pravidelném nechráněném pohlavním styku. Uvádí se, že 20-25% párů je nedobrovolně bezdětných. V polovině případů je příčina na straně ženy, v 40% na straně muže a z 10% je problém na straně obou partnerů. Ročně se objevují problémy s plodností až u 2 milionů párů na celém světě.

Celosvětovým zájmem v asistované reprodukci je snižovat počet přenesených embryí v programu in vitro fertilizace (IVF) a předcházet tak vícečetným těhotenstvím. Jelikož dvou a vícečetné těhotenství představují zdravotní riziko pro matku i plody, ideální je přenášet pouze jedno nejkvalitnější embryo. Tím se zvyšují také nároky na kvalitu přeneseného embrya. Aby se tohoto docílilo, vyvíjejí se a zlepšují se metody selekce embryí. Mezi tyto metody se řadí preimplantační genetický screening (PGS), preimplantační genetická diagnostika (PGD), sledování hladin metabolitů z metabolismu embryí a nejnovější time-lapse monitoring vývoje embryí, která se v praxi používá nejkratší dobu. Všechny metody selekce se neustále vyvíjejí a zdokonalují. Také některé embryologické laboratoře prodloužily dobu kultivace embrya ze tří na pět dní, protože delší kultivací se ukáže lépe kvalita embrya.

Také zdravotní pojišťovny v České republice podporují tento trend. Dříve proplácely 3 ukončené cykly IVF (rozumí se odběr vajíček po stimulaci vaječnicků, jejich oplodnění in vitro a transfer embryí). V současnosti přispívá pojišťovna i na čtvrtý cyklus IVF, pokud si klientka nechá v prvních dvou cyklech zavést pouze jedno embryo. To je výhodné jak pro klientky, tak pro pojišťovny, protože péče o nedonošené novorozence je několikanásobně vyšší než příspěvek na IVF.

4. Zadání bakalářské práce-cíl práce

Cílem práce je představit klasické i nové perspektivní metody v hodnocení kvality embryí pro zlepšení výsledků v centrech asistované reprodukce (CAR).

Dále porovnat z výsledků IVF centra Sanus v Pardubicích, jestli embrya vybraná k embryotransferu (ET) pomocí time-lapse monitoringu v porovnání s embryi vybranými k ET klasickým morfologickým hodnocením zvýší pregnancy rate (PR) (počet těhotenství/počet transferů embryí) u pacientek v závislosti na věku.

5. Od stimulace k transferu

Každým rokem přibývá párů, kteří mají problémy počít nebo donosit zdravé dítě a musí podstoupit IVF cyklus v CAR. To je způsobeno různými příčinami na straně muže a také stále vyšším věkem žen, které odkládají mateřství kvůli budování kariéry. Je prokázáno, že se zvyšujícím věkem ženy klesá její plodnost. Mezi ženské příčiny neplodnosti se řadí podle četnosti ovariální sterilita často na podkladě tzv. syndromu polycystických vaječníků (PCOS), neprůchodnost vejcovodů, endometrióza, imunologické příčiny, vady dělohy a další (Brindsen, 2007).

Před IVF je zapotřebí sepsat s párem rodinnou anamnézu a udělat ženě gynekologické a ultrazvukové vyšetření, vyšetřit hormonální profil menstruačního cyklu většinou 2-4.den cyklu a druhý asi týden před očekávanou menstruací. Pokud je indikace, bývá vhodné i imunologické a genetické vyšetření.

Hlavním mužským faktorem neplodnosti je špatná, nedostatečná nebo zcela chybějící tvorba spermií způsobená varikokélou (defekty malých žilních chlopní a nedostatečný odtok krve), dědičnými a genetickými poruchami, úrazem, infekcemi atd. (Doherty a Clark, 2006). Proto je prvotním vyšetřením muže spermiogram, kde se hodnotí vzhled a objem ejakulátu, celkový počet a koncentrace spermií, pohyblivost, morfologie a koncentrace přídatných buněk.(Příloha 1)

5.1 Stimulace vaječníků

Každý IVF cyklus začíná stimulací vaječníků léky, aby se získalo co nejvíce vajíček. Lékař sleduje ultrazvukem počet a velikost rostoucích folikulů, nápomocná může být i hladina estradiolu v krvi. Existuje několik stimulačních protokolů, ale nejčastěji se používá antagonistický protokol, který je šetrnější pro pacientku než dlouhý analogový. Při antagonistovi je menší spotřeba gonadotropinů, kratší doba stimulace (Marci et al., 2013). Ke stimulaci se používají gonadotropiny a od velikosti folikulů 12mm se připichuje antagonist bránící předčasné luteinizaci oocytů. Pokud největší folikul dosáhne velikosti 18 mm v průměru, indikuje se aplikace lidského choriového

gonadotropinu (hCG) a po 36 hod. se oocyty odsávají (Gardner et al., 2004). Při stimulaci vaječnicků gonadotropiny k IVF může dojít k přestimulování vaječnicků a rozvoji tzv. hyperstimulačního syndromu. Ten je nebezpečný hromaděním tekutin v tělních dutinách vlivem zvýšené tvorby vasoaktivní látky zvětšujícími se vaječníky způsobující zvýšenou propustnost kapilár (Brindsen, 2007). Je nutná zvýšená péče a sledování zdravotního stavu klientky. Syndrom odeznívá 1-3 týdny, při těhotenství déle a někdy je nutné provést miniinterupci pro záchranu zdraví pacientky. Pro tyto komplikace je dobré syndromu předcházet ultrazvukovou kontrolou a sledováním hladin estradiolu v krvi při stimulaci.

5.2 Aspirace oocytů

Aspirace oocytů s folikulární tekutinou se provádí transvaginálně v krátkodobé celkové anestezii pod kontrolou ultrazvuku. Poté se oocyty propláchnou v pracovním médiu a uloží do kultivačního média. Pro lepší práci s nimi se mohou trochu jehlou oříznout granulózní buňky. Samozřejmostí je rychlá a přesná práce embryologa, práce v laminárním boxu, podléhající nejpřísnějším požadavkům na čistotu ploch, snaha o udržování oocytů stále při teplotě 37°C (vyhřívané plotny u mikroskopu, vyhřívané stojany na zkumavky).

5.3 Příprava spermii

Ve stejný den jako je aspirace oocytů je nutné připravit také spermie, které se získají masturbací po 2-4 denní sexuální abstinenci klienta. Zhodnotí se spermioqram a spermie se zpracují metodou swim-up. Při této metodě se ejakulát (1-3 ml) promíchá s médiem (4,5 ml) a centrifuguje se 9 min při 1700 otáčkách. Po odpipetování supernatantu, složeného ze seminální plasmy a média, se sediment, který obsahuje živé, mrtvé spermie a přídatné buňky, opatrně překape čistým médiem a pod úhlem 45° se nechají spermie inkubovat při teplotě 37°C a 5% CO₂ 50 min. Po inkubaci se odsaje horní vrstva média obsahující nejrychlejší a nejkvalitnější spermie. Stejnou metodou se připraví kryokonzervované spermie a spermie dárců.

5.4 Metody oplození

Metody oplození jsou vybrány podle hodnot spermioqramu a příčinám neplodnosti po dohodě s klienty. Bohužel v dnešní době toto rozhodnutí také ovlivňují finanční možnosti páru, protože laboratorní metody jsou velmi nákladné. Ale nevhodně zvolená metoda oplození může celý cyklus zastavit neoplozením oocytů

5.4.1 In vitro fertilizace- klasická metoda

Tato metoda oplození se využívá u klientů, kde nemůže dojít přirozeně ke styku spermie s vajíčkem v důsledku neprůchodnosti vejcovodů. Předpokladem pro úspěšnou fertilizaci je dobrý spermioqram. Při klasickém IVF jsou spermie propláchnuty a zbaveny seminální plasmy metodou swim-up. Takto připravené spermie se přidají k oocytům do kultivačního média. Spermie oplodní vajíčko spontánně (Doherty a Clark, 2006). Za 17-20 hod. by měla být patrná u oplozeného vajíčka prvojádra (PN).

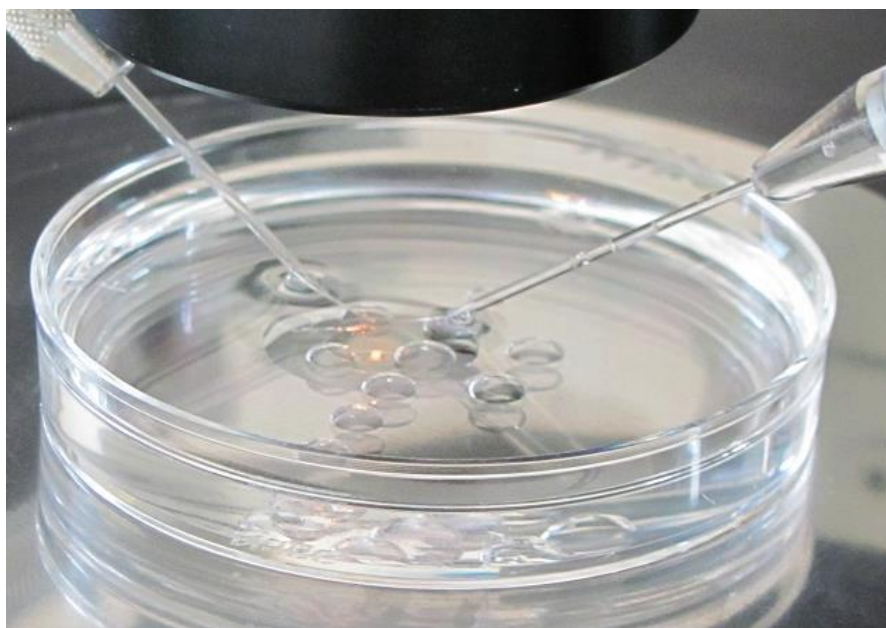
5.4.2 Mikromanipulační metody

Tyto metody jsou mladé a poskytují naději na vlastního potomka u klientů, kteří by měli na přirozené oplození minimální naděje. Je to většinou díky nedostačujícím hodnotám spermioqramu nebo při imunologickém faktoru neplodnosti. Poprvé bylo ICSI ve světě představeno jako metoda oplození v roce 1993 (Bowen et al., 1998) a už o rok později se v ČR narodilo 1. dítě po oplození touto metodou. Mikromanipulačními metodami se vybírají ty nejkvalitnější spermie, také nejčastěji připravené metodou swim-up, ale používají se také spermie získané metodou mikrochirurgické aspirace spermií z nadvarlete (MESA) a mikrochirurgickou extrakcí z tkáně varlete (TESE). Před oplozením se odstraní kumulární komplex a corona radiata kolem vajíčka působením hyaluronidázy (cca 30-60s) a poté propláchnutím v pracovním médiu s opakovaným nasáváním do pipety s průměrem 150 mikrometrů, dokud nedojde k obnažení oocytu.

5.4.2.1 Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI)

Pod mikroskopem vybírá embryolog podle pohyblivosti a morfologických znaků nejvhodnější spermie. Vybranou spermii imobilizuje klepnutím po bičíku a nasaje ji do ICSI pipety. Dále si přidrží oocyt holding pipetou tak, aby pólócyt byl v poloze 6 nebo 12. Spermii si posune těsně k hrotu pipety, pipetou pronikne zonou pelucida a oolemou do vajíčka a nasaje cytoplazmu i se spermií do pipety. Dojde k promísení. Poté vysaje cytoplazmu se spermií zpět do oocytu (Obr.2). Pracuje se na vyhřívané plotně a vajíčka jsou v kapkách média na Petriho misce pod dostatečně vysokou a vyhřátou vrstvou oleje (Obr.1) (Schlegel a Girardi, 1997). Po uplynutí 17-ti hod. se kontroluje oplození přítomností dvou PN a 2. polového tělíska (PT).

Obr. 1 Petriho miska s mikrokapkami média překrytými olejem



Obr. 2 Oocyt přichycený podtlakem k holding pipetě a ICSI pipeta u hrotu se spermíí před proniknutím zonou pelucida a oolemou.



5.4.2.2 Morfologicky selektovaná injekce spermie (IMSI)

IMSI je metoda založená na výběru spermie stejně jako při ICSI, ale pod zvětšením až 8000x. Díky tomuto zvětšení jsou vidět i vakuoly v hlavičce spermie a abnormality způsobené DNA fragmentací. Tato metoda je závislá na speciálním objektivu, který je dost nákladný, proto tuto metodu nenabízí všechna centra.

5.4.2.3 Preselektovaná intracytoplazmatická injekce spermie (PICSI)

Preselekce u PICSI spočívá na vazbě zralé spermie na složku obsaženou v cumulus oophorus. Touto látkou je hyaluronan. Při PICSI je hyaluronan přítomen v gelu na Petriho misce. K ICSI se vybírají pouze spermie, které jsou navázané k hyaluronanu v gelu receptory. V praxi to vypadá tak, že hlavička spermie je přichycena k hyaluronanu a bičík se pohybuje. To je známka zralosti spermie. Tato metoda je nenáročná na vybavení, je však náročnější na čas a zručnost embryologa (Žáková et al., 2010).

5.5 Kultivace embryí

Pro kultivaci se musí vytvořit podmínky co nejvíce podobné podmínkám v lidském těle. Kvalitní růst a vývoj embryí probíhá v inkubátorech při teplotě 37°C, sycení CO₂ 6-ti % a vlhkém vzduchu. Embrya se rýhují ve speciálních miskách a kultivačních médiích opatřených certifikátem o nezávadném použití pro lidské buňky. Výrobců a typů je velmi mnoho. Kultivace může probíhat až 5 dnů.

5.5.1 Den 0

Den 0 je označován den aspirace oocytů. Při oplození mikromanipulačními technikami se po odstranění granulózních buněk vytřídí zralá vajíčka, která se oplodňují. Nezralá vajíčka se neoploďují. Při oplození klasickou metodou IVF se granulózní buňky neodstraňují před přidáním spermií kvůli akrozomální reakci, ale až za 17 hod. od inseminace, aby se zkontrolovala přítomnost PN a polocytů.

5.5.2 Den 1

Po 17-18-ti hod. kultivaci jsou na oplozených oocytech patrná 2 PN a vyloučené 2.polové tělísko, samčí a samičí- stádium zygoty (Obr.3a). Pokud vzniknou zygoty s jiným počtem PN než 2, došlo k abnormálnímu oplození. Asi za 20hod. po inseminaci dochází ke kondenzaci PN a nastává 1. mitotické dělení (Veeck a Zaninovič, 2003). Za 24 - 27 hodin od inseminace lze pozorovat dvoubuněčné embryo (Obr. 3b)(Boiso et al., 2002).

Obr. 3a zygota



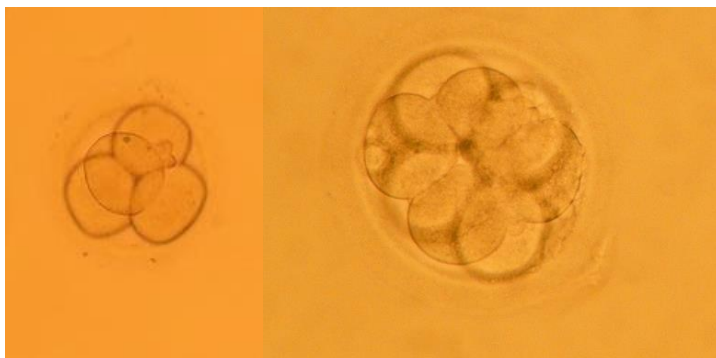
Obr. 3b 2bb embryo



5.5.3 Den 2 a 3

V den 2 kultivace (40-50 hod. od oplození) jsou nejlepší známkou kvality a normálního vývoje 4bb embryo a v den 3 8bb embryo. (Obr. 4) Lze pozorovat i jiné než sudé počty buněk, to je v důsledku časově asynchronního dělení buněk (Vacek, 2006).

Obr. 4 4bb a 8bb embryo



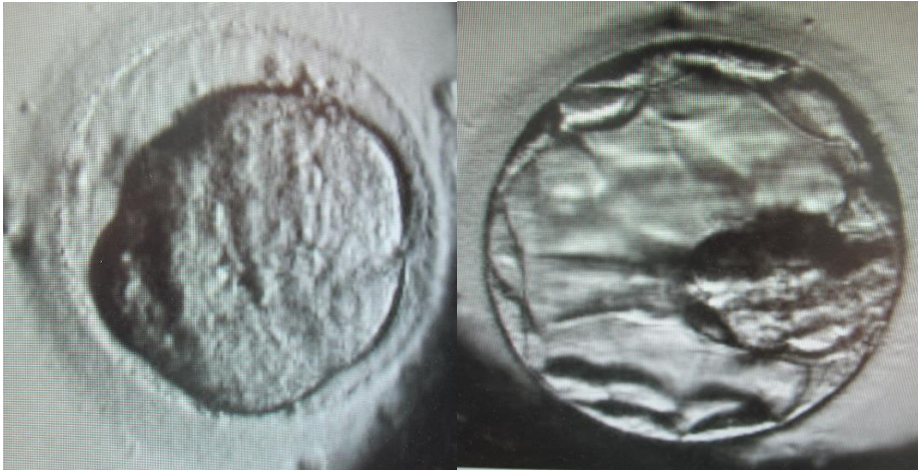
5.5.4 Den 4 a 5

V těchto dnech dochází k dalšímu dělení buněk, po 16-ti buněčném stádiu již nelze buňky spočítat. Dochází ke splynutí buněk do stádia moruly a následně kompaktace v den 4 kultivace (Boiso et al., 2002) (Obr. 5a). Mezi dnem 4 a 5 kultivace vzniká v morule dutina vyplněná tekutinou. Časná blastocysta je tvořena z vnitřní masy buněk

(základ pro vznik zárodku) a z vnější části oploštělých buněk (základ pro trofoblast a placentu). (Campbell a Reece, 2008). (Obr. 5b)

Obr. 5a Kompaktace

Obr. 5b Časná blastocysta



5.6 Transfer embryí

Obvykle 3.-5. den po oplození se 1-2 vyselektovaná nejkvalitnější embrya zavádějí zpět do dělohy v ambulantním režimu tenkou kanylou (katetr) (Obr.6), která také disponuje nezbytným certifikátem použití pro lidská embrya. Zbylá kvalitní embrya je možné si nechat zamrazit a uskladnit v tekutém dusíku pro případné další využití. Těhotenský hormon hCG se zjišťuje 14 dní po embryotransferu (ET) z krve a k ověření případného těhotenství dochází přibližně 14 dní od pozitivního krevního testu ultrazvukem. Zjišťuje se přítomnost gestačního vaku v děloze a akce srdeční u embrya.

Obr.6 Transferový katetr



6. Metody hodnocení pro selekci zygot a embryí

Vzhledem k tomu, že vzrůstá zájem vybrat k ET pouze jedno nejkvalitnější embryo, vyvíjejí se metody, které pomáhají zjistit co nejvíce o vývoji embryí. Zachycení aneuploidií je velmi významné pro výběr embrya, neboť představuje jednu z nejdůležitějších příčin selhání implantace a potratu (Fragouli, 2014). Metodami pro hodnocení kvality jsou: klasické morfologické, PGD a PGS, pomocí metabolických kritérií a morfokinetické time-lapse systémy.

6.1 Klasická morfologická hodnocení

Morfologické hodnocení se používá od počátku vzniku a vývoje asistované reprodukce a je základní metoda i dnes. Embrya se prohlížejí pod světelným mikroskopem každý den a hodnotí se různé parametry buněk. Zygoty jsou hodnoceny hlavně podle PN a polocytů. Embrya potom podle počtu blastomer, jejich velikostí a souměrností, procent fragmentací, přítomností vakuol nebo zrnění v cytoplazmě.

6.1.1 Hodnocení kvality zygot

K hodnocení zygot dochází po 17-20hod. od oplození. Bývá hodnocena velikost a počet PN a dále počet jadérek (PNB) v PN a jejich umístění. (Tesařík a Greco, 1999) Nejpoužívanější metodou je třídění dle Scottové tzv. Z-score. Za Z1 jsou považovány zygoty, které mají stejnou velikost a počet PNB a jsou zarovnané do roviny. Počet všech PNB je 3-7. Jako Z2 jsou označeny zygoty se stejnou velikostí PN a stejným počtem PNB, které ale nejsou srovnány v jedné rovině, jsou volně rozptýlené. Z3 jsou takové, které mají stejnou velikost PN, ale počet a velikost PNB se liší. PNB mohou být v jedné rovině nebo rozptýlené. Z4 mají odlišnou velikost PN nebo na sebe nenaléhají (Scott et al., 2000).

6.1.2 Hodnocení kvality embryí

Embrya se hodnotí každý den kultivace 1x max. 2x. Sleduje se počet buněk, popř. přítomnost 1 jádra v blastomeře, procento fragmentace cytoplazmy. Fragmentacemi se rozumí malé části cytoplazmy ohraničené membránou, vznikající hlavně při dělení buněk. Důležitý je typ fragmentace. Při tvorbě velkých fragmentů jsou poškozena embrya větší, jelikož dochází k vyloučení velké části cytoplazmy i s organelami a dochází k vyčerpání základních organel, může být přítomna i DNA. Malé fragmenty do určitého množství nemají rozhodující vliv na vývoj a vznikají při cytokinezi. Fragmenty mohou být umístěny v jednom místě nebo roztroušené po celém embryu. Také se sleduje velikost blastomer, drobná nerovnost může být, ale pokud dojde při 1. dělení ke vzniku dvou hodně odlišně velkých blastomer, zvyšuje se pravděpodobnost na aneuploidní dělení (Veeck a Zaninovič, 2003). Při klasickém hodnocení je zapotřebí zkušeného embryologa na rozpoznání blastomery vs. velkého fragmentu.

Nejkvalitnější embrya mají sudý počet buněk, v každé 1 jádro a 0% fragmentací, takové je hodnoceno známkou 1. Embryo se sudým počtem souměrných buněk s fragmentacemi do 10-ti % dostává známku 2. Pokud tvoří embryo nesouměrně velké buňky bez fragmentů, má hodnocení 3. Známkou 4 dostává embryo s velikostně nesourodými i stejně velkými buňkami a s obsahem fragmentací nad 20%. Pokud nejsou v embryu přes rozsáhlé fragmentace patrné blastomery je hodnoceno za 5 (Machtinger a Racowsky, 2013).

6.2 Hodnocení kvality na základě metabolomiky a proteomiky

Tato metoda je poměrně mladá a je stále zkoumána. Metabolomika a proteomika je velmi náročná na instrumentaci a ačkoli pilotní studie dávala jisté naděje, randomizovaná kontrolovaná studie předpoklady nepotvrdila. Další metabolomické studie probíhají, ale ještě nejsou k dispozici pro rutinní klinické použití (Montag et al., 2013a). Pro tyto důvody se zatím nevyužívá v běžné praxi.

Základem je identifikace a zjištění koncentrace metabolitů vylučovaných embryi do kultivačního média, které souvisí s růstem a schopností implantace. Základní instrumentální analytickou metodou pro analýzu je kapilární elektroforéza, dále se využívají chromatografické metody a hmotnostní spektrometrie. Mezi metabolity, které bývají předmětem zájmu se řadí pyruvát, glukóza, aminokyseliny, kyslík (Crha et al., 2012). Dále se zjišťuje exprese lidského leukocytárního antigenu (HLA-G). Pokud je přítomen v médiu, zvyšuje se úspěšnost implantace (Sher et al., 2004).

6.3 PGD a PGS

Obě jsou to invazivní, velmi moderní, rozvíjející se a mladé metody s určitým potenciálem do budoucna. Jsou neodmyslitelně spjaté s IVF, odběrem 1-2 blastomerů v den 3 kultivace nebo buňky trofoektodermu z blastocysty po narušení zony pelucidy laserem nebo naříznutím. To vyžaduje vysokou erudovanost embryologa nebo genetika. Je možné vyšetřit i oocyty nebo zygoty odebráním 1.PT. U PGD je nutné předem připravit nebo zakoupit hybridizační sondy a čipy (microarray) pro konkrétní dědičnou nemoc (Montag, 2013b). Dále se využívají metody molekulární biologie jako polymerázová řetězová reakce (PCR) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Odběr blastomerů v den 3 kultivace umožňuje transfer čerstvého embrya ve stádiu blastocysty po provedené analýze, při odběru buněk trofoektodermu se embrya zamrazí, vzorky vyšetří a následně se při kryoembryotransferu zavedou embrya bez genetické zátěže (Bečvářová, 2006).

PGD umožňuje vyloučení přítomnosti dědičných onemocnění embrya ještě před jeho zavedením do dělohy a umožňuje partnerům s genetickou zátěží vyloučit přenos závažných dědičných chorob na své potomky.

PGS je genetické vyšetření embryí, které slouží k vyloučení nově vznikajících chromozomálních aneuploidií (příliš mnoho nebo málo chromozomů), což způsobuje časnou těhotenskou ztrátu (Brezina et al., 2013).

Je otázkou diskuzí, jestli PGS i PGD nabízet paušálně. Nevýhodou je, že u PGS se nedají vyšetřit všechny chromozomy, ale jen nejčastěji vyskytující se trizomie

u porodů (13,18,21,X,Y) a spontánních abortů (16,22,15,21) (Bečvářová, 2006). Jelikož jsou PGD i PGS invazivní metody, hrozí riziko poškození embrya při odběru blastomer a je třeba brát v úvahu možnost mozaicismu embrya, kdy část buněk je euploidní a část aneuploidní. Pak záleží na tom, která blastomera se odebere. Proto tato metoda není 100% účinná a bezchybová.

6.4 TIME-LAPSE MONITORING

Tuto metodu lze také nazvat morfokinetickou, jelikož se zde kloubí hodnocení morfologické a sledování načasování dělení buněk s pravidelností dělení. Je to šetrná neinvazivní metoda, která také stále podléhá zdokonalování a mnoho vědců ve světě stále hledá nejideálnější parametry pro výběr embryí k ET s největším potenciálem k uhnízdění.

Principem metody je osvětlení misky s embryi bílým světlem emitující led diodou a vytvořením snímku kamerou v předem nadefinovaných časových intervalech. Osvětlení led diodou trvá přibližně 30- 80ms. Nakahara et al.(2010) a Kirkegaard et al. (2012) nenašli žádné významné rozdíly v morfologii rýhování buněk mezi embryi, které byly kultivovány v time-lapse monitoringu a kontrolní skupinou kultivovanou v běžném inkubátoru. Software v PC vytvoří videosekvenci z těchto snímků a dále umožňuje nastavit mikroskop a označit v sekvenci nejdůležitější body v dělení buněk.

Bylo zjištěno, že se embryo do 3. mitózy rýhuje pod genomem oocyty a poté nastupuje rýhování buněk pod genomem embrya. Proto intervaly mezi mitózami nejsou stejné, ale nejdelší je až po 4. mitóze, kdy probíhá transkripce genů a embryonálních proteinů. Nejdůležitější pro výběr embrya je dodržení intervalů interfází a synchronizace mitóz. Vitální embrya se rýhují ve vymezených a v každé mitóze synchronních časových intervalech v prvních čtyřech mitózách. (Hlinka et al., 2012). Embrya označená jako early cleavage (EC) (1.mitóza 22-26 hod. po oplození), mají největší potenciál k úspěšné implantaci (Lundi et al., 2001). Kinetika časného embryonálního dělení souvisí se schopností embrya dospět do stádia blastocysty (Cruz et al., 2012).

Také bylo popsáno, že embrya EC setrvávají v interfázi mezi 2bb a 3bb stadiem kratší dobu, než embrya s pomalejším cyklem (Hampl a Štěpán, 2013). Rovněž bylo vyzorováno, že u embryí, které se z dvoubuněčného stádia rýhují na třibuněčné za méně než 5 hod, mají signifikantně nižší implantační potenciál než embrya s normálním buněčným cyklem (10-12 hod.) (Rubio et al., 2012). Výhodou time-lapse je, že se embrya téměř nevyndávají z inkubátoru, tudíž jsou dodrženy konstantní podmínky in vitro kultivace a tím se snižuje riziko poškození dělicího aparátu embrya (Kiessling, 2010). Na základě počítačové analýzy lze vybrat nejkvalitnější embryo, které má nejlepší potenciál k úspěšnému uhnízdění po ET.

V současné době využívají centra asistované reprodukce 3 systémy time-lapse od různých výrobců. Eeva a PrimoVision jsou zařízení, které se umísťují do klasických inkubátorů v embryologické laboratoři, EmbryoScope je speciální inkubátor.

6.4.1 Eeva

Eeva (Early embryo viability assessment) je systém vytvořený firmou Auxogyn v USA a skládá se ze speciálního optického mikroskopu s kamerou, který snímá embryo a počítače se speciálním softwarem, který může pomoci označit embrya v den 3 kultivace s potenciálem vstoupit do stádia blastocysty. Používají se speciální kultivační misky pro Eeva systém (URL 1). Tento systém není využíván v ČR.

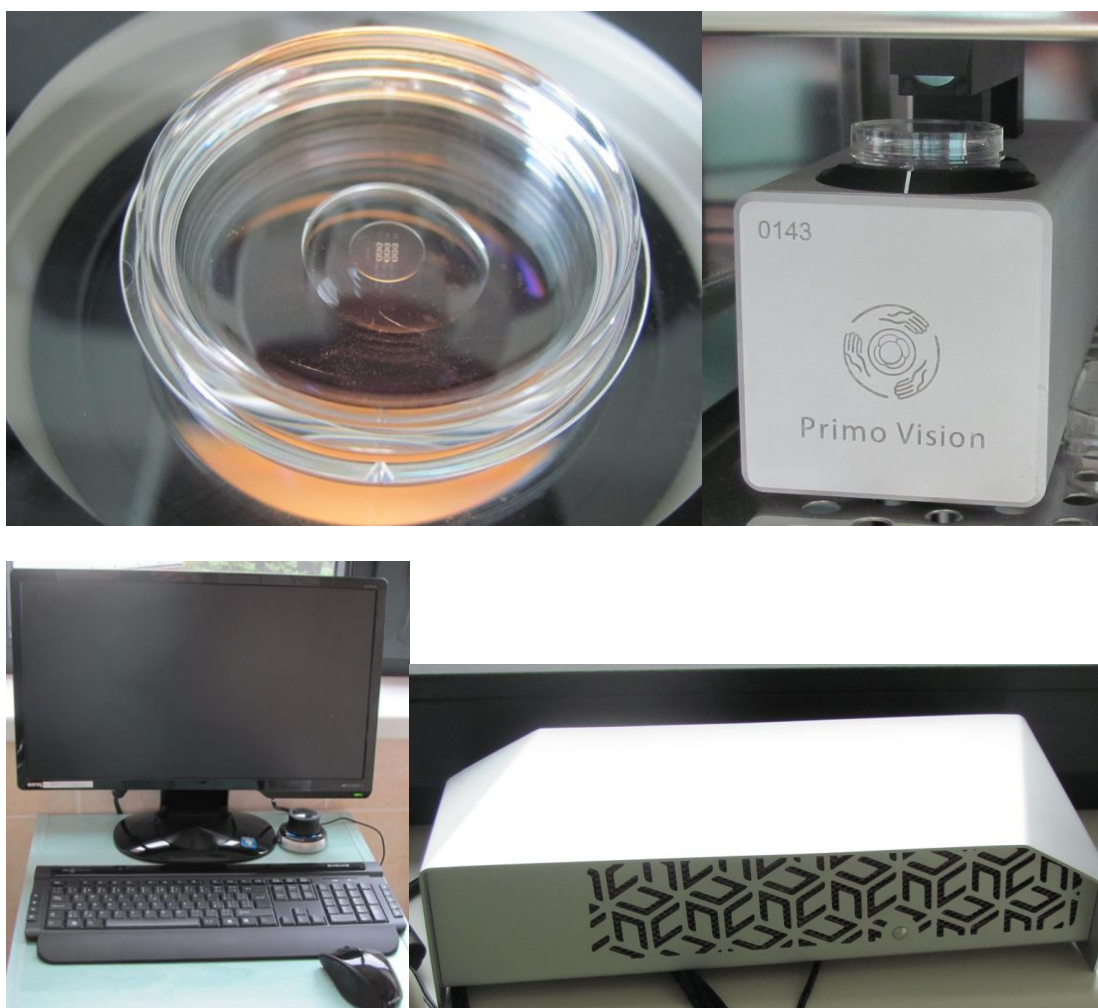
6.4.2 EmbryoScope

Tyto speciální tříplynové inkubátory se zabudovanou kamerou splňující podmínky kultivace jsou vyrobeny firmou Unisense FertiliTech v Dánsku (URL 2). Umožňuje současně monitorovat až 72 embryí a sbírá data v technologii 4D (Meseguer et al., 2011). Tato technologie je ve světě nejvíce využívána.

6.4.3 PrimoVision

Systém je vyvinutý firmou Cryo-Innovation z Maďarska. V nedávné době odkoupila know-how firma Vitrolife ze Švédska (URL 3). Skládá se z optického mikroskopu s kamerou a počítače se speciálním softwarem. K systému se používají 9-ti nebo 16-ti jamkové misky (Obr.7). Jamky se naplní kultivačním médiem v dostatečném množství a překryjí dostatečně velkou a vyhřátou vrstvou oleje. Také tento systém může sestavit videosekvenci o průběhu kultivace a načasování dělení buněk a vyhodnotí embrya s největším potenciálem k uhníždění.

Obr. 7 Systém PrimoVision (kultivační miska, snímací kamera, monitor a počítač)



7. Experimentální část

7.1 Metodika a materiál

Do srovnávání bylo zařazeno celkem 355 cyklů IVF/ICSI, všechny proběhlé v CAR Sanus Pardubice od 1.1.2012 - 31.1.2013. IVF/ICSI cykly v antagonistickém protokolu s GnRH antagonisty (Cetrotide, Německo a Orgalutran , Holandsko) a rekombinantním FSH (Gonal, Německo, Puregon, Holandsko) byly rozděleny do 2 skupin: s výběrem embryí pomocí time-lapse PrimoVision (PV) (Cryo-Innovation, Maďarsko) s frekvencí snímání 1 obrázek za 12 min. a s klasickým morfologickým hodnocením. Dále každá skupina byla rozdělena do 3 skupin podle věku klientek na: ≤ 30 let, 31-35 let, ≥ 36 let. Všechny oocyty byly oplodněny metodou ICSI a kultivovány v sekvenčních médiích fi Vitrolife (Švédsko). Kultivační podmínky standardní: 37°C, 6% CO₂, vlhký vzduch. V time-lapse systému byly použity kultivační misky WOW dishes 9 wells (Cryo-Innovation, Maďarsko). Klasicky hodnocená embrya byla kultivována v miskách Nunc (Thermo Scientific, USA). Při hodnocení zygot se sledoval počet a umístění PN a PT a umístění PNB. U hodnocení kvality embryí se sledoval počet, souměrnost buněk a % fragmentací. ET byl proveden po 5-ti denní kultivaci. Odběr hCG byl proveden 14 dní po ET. Žádný cyklus nebyl ukončen před ET. Jako pozitivní výsledek bylo bráno prokázání gestačního váčku ultrazvukem 14 dní po odběru krve na hCG.

7.2 Charakteristika souboru

Obě skupiny cyklů měly stejné indikace k IVF, nejčastěji faktory: andrologický, dále tubární, endometrióza, anovulace, věkový, ale také kombinace příčin neplodnosti.

Celkem bylo v souboru 355 cyklů, z toho 111 v hodnocení v time-lapse a 244 klasickým hodnocením.

8. Výsledky

V období leden 2012- prosinec 2013 bylo realizováno v car Sanus Pardubice celkem 355 cyklů, z toho 111 v PrimoVisionu a 244 bez PV. V tabulce č.1 je vidět celková PR bez rozdělení na věk pacientky. Celková PR byla 43,1 %, bez PV 43,4%, s PV 42,3% (Tab 1). Je patrné, že průměrná PR je shodná celkově i u cyklů s PV a bez PV. Cesta k této hodnotě je ale rozdílná v závislosti na věku.

Tabulka 1. Celkový přehled PR u cyklů bez rozdělení dle věku

	Celkem	S PV	Bez PV
Cyklů	355	111	244
Průměrný počet embryí na ET	1,4	1,4	1,4
G+(gravidit)	153	47	106
% PR	43,1	42,3	43,4

V souboru bez použití PV bylo ve věkové hranici < 30 let PR 43,8 %, ve věkovém rozmezí 31-35 let PR 50 %, po 36 roku PR 34,2 % (Tab 2a) (Graf 1a). V souboru s PV byly tyto výsledky: < 30 let PR 37,5 %, 31-35 let PR 38,2 %, \geq 36 let PR 58,3 % (Tab 2b) (Graf 1b).

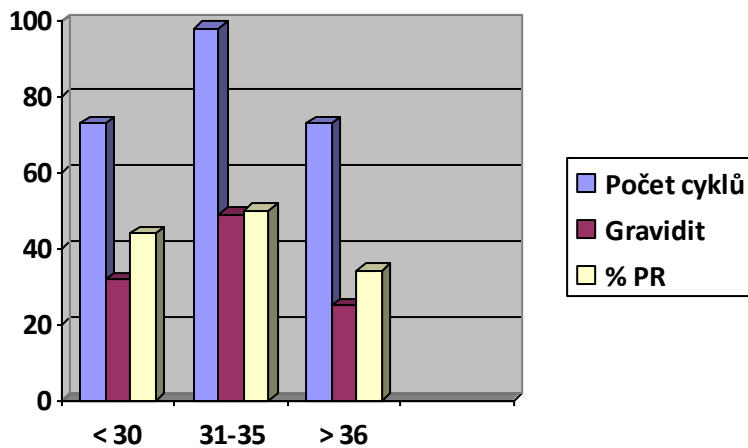
Tabulka 2a. Souhrn výsledků cyklů bez PV

	≤ 30 let	31-35 let	≥ 36 let
Počet cyklů	73	98	73
Průměrný počet embryí na ET	1,3	1,3	1,6
G+(gravidit)	32	49	25
% PR	43,8	50	34,2

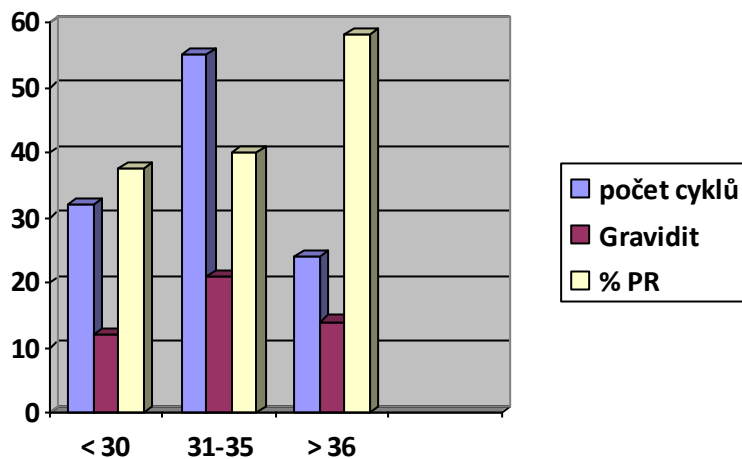
Tabulka 2b. Souhrn výsledků cyklů s použitím PV

	≤ 30 let	31-35 let	≥ 36 let
Počet cyklů	32	55	24
Průměrný počet embryí na ET	1,3	1,4	1,5
G+(gravidit)	12	21	14
% PR	37,5	38,2	58,3

Graf 1a. Souhrn výsledků cyklů bez PV



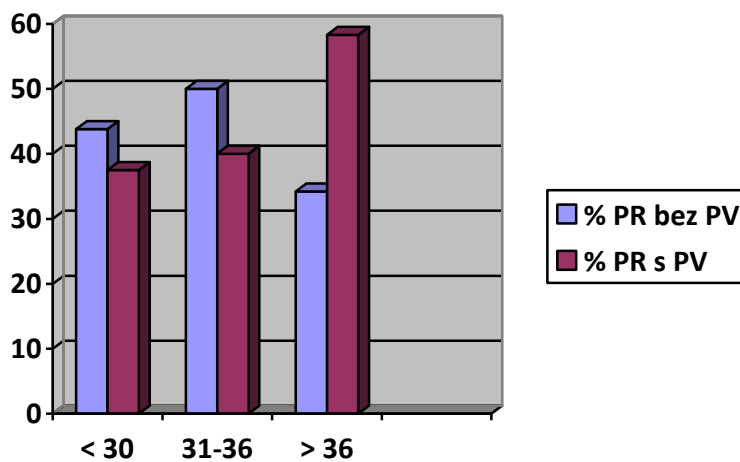
Graf 1b. Souhrn výsledků cyklů s použitím PV



S PV- IVF cykly s použitím time-lapse monitoringu Primovision k hodnocení kvality embryí
 Bez PV - IVF cykly s klasickým morfologickým hodnocením kvality embryí
 PR – klinická těhotenství potvrzená přítomností gest. vāčku; (%)

Z grafu 2 je viditelné, že u klientek ve věkových hranicích ≤ 30 let a 31-35 let byly výsledky PR nižší u použití PV k výběru embryí na ET než klasickému výběrem. U klientek ≥ 36 roků byla naopak vyšší PR u systému time-lapse.

Graf 2. Srovnání PR u cyklů s PV a bez PV podle věku klientek



% PR bez PV– klinická těhotenství potvrzená přítomností gest. vāčku bez použití PV; (%)
% PR s PV– klinická těhotenství potvrzená přítomností gest. vāčku s použitím PV; (%)

9. Diskuze

Hlavním úkolem práce bylo ukázat, jestli systém time-lapse monitoring zvýší PR u pacientek v závislosti na věku klientek. V car Sanus Pardubice disponují tímto systémem od prosince 2011 a tato práce porovnává výsledky za první 2 roky provozu. Jak bylo uvedeno v úvodu práce, je trendem transferovat 1 nejkvalitnější embryo. Průměr embryí na transfer je celkem 1,4, což je snížení oproti stavu v roce 2006, kdy bylo průměrně v CAR Pardubice transferováno 1,8 embryí. Se vzrůstajícím věkem klientek stoupá průměr transferovaných embryí.

V celkovém souhrnu jsou výsledky bez PV i s PV srovnatelné. Podle předpokladů by systém time-lapse měl zvýšit PR u všech věkových kategorií. Je překvapivé, že u skupin ≤ 30 let a 31-35 let byla nižší PR s použitím PV než bez něj. Může to být způsobeno faktem, že soubory nejsou velké a výběr nebyl náhodný, ale kdo si zaplatil tento systém. Pro cyklus s PV se rozhodly klientky s jedním nebo dvěma neúspěšnými cykly IVF jako s možným řešením problému, ale bohužel, u některých nebylo ani jedno úplně správně se vyvíjející embryo a proto se transferovalo to, které se nejvíce podobalo ideálnímu dělení. Systém PV ale naopak pomohl zvýšit PR u kategorie ≥ 36 let, takže je zde vidět přínos pro zlepšení výběru embryí spíše u starších klientek, u kterých je vyšší pravděpodobnost aneuploidních embryí.

Výborné je, že při použití tohoto systému je vidět, jakým způsobem se embryo rýhuje a dají se vybrat opravdu nejkvalitnější embrya buď k ET nebo ke kryokonzervaci. Také je výhodou, že se embrya téměř nemusí vyndávat z inkubátoru a tím se nenarušují ideální podmínky pro život embryí. Další klad a využití tohoto systému vidím v možnosti promítnout klientce vývoj jejich embryí, aby lépe pochopila rozdíly správného a nesprávného vývoje. Většinou je pro pacientky těžké se smířit s tím, že jejich embrya nejsou kvalitní, když to nevidí na vlastní oči. Určitě bych tento systém doporučovala, pokud klientka prodělala těhotenské ztráty nebo absolvovala neúspěšný cyklus IVF a je podezření na abnormální dělení buněk.

10. Závěr

V celkovém počtu cyklů nebyl nalezen rozdíl v úspěšnosti mezi cykly s PrimoVisionem a bez tohoto systému. Při rozdělení klientek podle věku byly výsledky pregnancy rate nižší s PrimoVisionem ve skupinách klientek ≤ 30 let a 31-35 let. U těchto skupin metoda time-lapse nepřispěla k lepším výsledkům než klasické hodnocení vývoje embryí. Užitečnost systému time-lapse se projevila u klientek ve skupině ≥ 36 let, kde byly výsledky lepší s time-lapse monitoringem než bez něj.

11. Přílohy

Příloha 1: Protokol o vyhodnocení spermogramu

PRVNÍ PRIVÁTNÍ CHIRURGICKÉ CENTRUM, spol. s r.o.	Spermogram	 Strana 1 / 1
Pracoviště - Pardubice		

Jméno pacienta Rodné číslo Pojišťovna

Jméno manželky/partnerky Rodné číslo

Datum odběru Lékař žádající vyšetření

Spermogram:

Vzhled - normální - abnormální

Viskozita - normální - abnormální

Kolikvace - normální - abnormální

	Nativní ejakulát	Referenční hodnoty
Objem ejakulátu [ml]		> 1,5
Celkový počet spermií v ejakulátu [mil.]		> 39
Koncentrace spermií v 1 ml ejakulátu [mil/ml]		> 15
Celková motilita spermií [% progresivních a neprogresivních sp.]		> 40
Progresivní motilita spermií [%]		> 32
Morfologie [% morfologicky normálních forem]		> 4
Aglutinace		záznam o přítomnosti
Koncentrace kulatých buněk v 1 ml ejakulátu [mil/ml]		< 5

Závěr: normospermie oligospermie astenospermie teratospermie

azoospermie aglutinace vyšší koncentrace buněk hypospermatismus

Poznámky:

.....
Vyšetření provedl:
razítko a podpis

.....
Za provedení odpovídá:
razítko a podpis

F 07 - 08/26 - PA/E

Tento formulář je majetkem společnosti PRVNÍ PRIVÁTNÍ CHIRURGICKÉ CENTRUM, spol. s r.o. a je určen pouze pro vnitřní potřebu.
Rozmnožování a jeho předávání mimo společnost je možné pouze se souhlasem jednatele společnosti.

12. Seznam obrázků a tabulek a grafů

Obrázky: (u všech obrázků zdroj vlastní)

Obrázek 1: Petriho miska s mikrokapkami média překrytými olejem

Obrázek 2: Oocyt přichycený podtlakem k držící pipetě a ICSI pipeta u hrotu se spermíí před proniknutím zonou pelucida a oolemou.

Obrázek 3a: Ukázka zygoty se samčím a samičím prvojadrem a dvěma pólými tělísky

Obrázek 3b: Ukázka dvoubuněčného embrya

Obrázek 4: Ukázka čtyřbuněčného a osmibuněčného embrya

Obrázek 5a: Ukázka kompakovaného embrya

Obrázek 5: Ukázka časně blastocysty

Obrázek 6: Příklad transferového katetru

Obrázek 7: Systém Primovision (kultivační miska, snímací kamera, monitor a počítač)

Tabulky:

Tabulka 1: Celkový přehled PR u cyklů bez rozdělení dle věku

Tabulka 2a: Souhrn výsledků cyklů bez PV

Tabulka 2b: Souhrn výsledků cyklů s použitím PV

Grafy:

Graf 1a: Souhrn výsledků cyklů bez PV

Graf 1b: Souhrn výsledků cyklů s použitím PV

Graf 2: Srovnání PR u cyklů s PV a bez PV podle věku klientek

13. Použitá literatura

1. **Bečvářová V.:** Preimplantační genetická diagnostika a její místo v současné asistované reprodukci, *Gynekolog* 2006, č. 6, s. 220-224.
2. **Boiso I., Veiga A., Edwards R. G.:** Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer, *Reprod Biomed Online*. 2002 Nov-Dec; 5(3): s. 328 – 350.
3. **Bowen J.R., Gibson F.L., Leslie G.I., Saunders D.M.:** Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection, *Lancet*. 1998 May 23; 351(9115): s. 1529-34.
4. **Brezina P.R., Ke R.W., Kutteh W.H.:** Preimplantation genetic screening: a practical guide, *Clin Med Insights Reprod Health*. 2013 Feb 27; 7: s. 37-42.
5. **Brindsen P.R.:** Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction, 3. vydání, Informa Healthcare, 2007, 688 s.
6. **Campbell, N. A., Reece, J. B.:** Biologie, 1.vydání, Computer Press, 2008, 1338 s.
7. **Crha I., Mádr A., Musilová J., Glatz Z., Žáková J., Ventruba P.:** Nové technologie a perspektivy analýzy metabolomu embrya, *Čes. Gynek.* 2012; 77, č. 6, s. 502-506.
8. **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 Oct; 25(4): s. 371-81.
9. **Doherty C.M., Clark M.M.:** Léčba neplodnosti – podrobný rádce neplodným párům, 1. vyd., Computer Press a. s., 2006, 121 s.
10. **Fragouli E., Alfarawati S., Spath K., Wells D. Mol:** Morphological and cytogenetic assesment of cleavage and blastocyst stage embryos, *Hum Reprod*. 2014 Feb; 20(2): s. 117-26.
11. **Gardner D.K., Weissman A., Howles C.M. ,Shoham Z.:** Textbook of assisted Reproductive technique, 1.vydání, Taylor & Francis, 2004, 984 s.
12. **Hampl R., Štěpán M.:** Variabilita v načasování dělení lidských embryí monitorovaných systémem time-lapse v závislosti na věku pacientky, *Česká Gynekol.* 2013 Dec; 78(6): s. 531-6.

13. **Hlinka D., Lazarovská S., Rutarová J., Pichlerová M., Rezáčová J., Dudás M.:** Non-invasive monitoring of the timing of early embryo cleavages-objectively measurable predictor of human embryo viability, *Česká Gynekol.* 2012 Feb; 77(1): s. 52-7.

14. **Kiessling A.:** Timing is everything in the human embryo, *Nature Biotechnol.* 2010 Oct; 28(10): s. 1025–1026.

15. **Kirkegaard K., Hindkjaer J.J., Grøndahl 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 Assist Reprod Genet.* 2012 Jun; 29(6): s. 565–572.

16. **Lundin K., Bergh C., Hardarson T.:** Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF, *Hum Reprod.* 2001 Dec; 16(12), s. 2652-2657.

17. **Machtinger R., Racowsky C.:** Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence, *Reprod Biomed Online.* 2013 Mar; 26(3): s. 210-21.

18. **Marci R., Caserta D., Lisi F., Graziano, Soave J., Lo Monte G., Moscarini M.:** In vitro fertilization stimulation protocol for normal responder patients, *Gynecol Endocrinol.* 2013 Feb; 29(2): s. 109-12.

19. **Meseguer M., Herrero J., Tejera, Hilligsøe K.M., Ramsing N.B., Remohí J.:** Use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation, *Hum Reprod.* 2011, Oct; 26(10): s. 2658-71.

20. **Montag M., Toth B., Strowitzki T.:** New approaches to embryo selection, *Reprod Biomed Online.* 2013a, Nov; 27(5): s. 539-46.

21. **Montag M., Toth B., Strowitzki T.:** Preimplantation diagnosis-PID: preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS), *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2013b Dec; 56(12): s. 1670-8.

22. **Nakahara T., Iwase A., Goto M., Harata T., Suzuki M., Ienaga M., Kobayashi H., Takikawa S., Manabe S., Kikkawa F., Ando H.:** Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos, *J Assist Reprod Genet.* 2010 Feb; 27(2-3): s. 93-6.

23. **Nicoli A., Capodanno F., Rondini I., Valli B., Villani M.T., Morini D., De Pascalis L., Palomba S., La Sala G.B.J.:** Pronuclear morphology evaluation in in vitro fertilization (IVF) /intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a retrospective clinical review , *J Ovarian Res.* 2013 Jan 3; 6(1): s. 1.

24. **Rubio I., Kuhlmann R., Agerholm I., Kirk J., Herrero J., Escribá M.J., Bellver J., Meseguer M.:** Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study, *Fertil Steril*. 2012 Dec; 98(6): s. 1458-63.
25. **Scott L., Alverdo R., Leondires M., Miller B.:** The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation, *Human Reproduction*, 2000 Nov; 15(11): s. 2394-2403.
26. **Sher G., Keskinetepe L., Nouriani M., Roussev R., Batzofin J.:** Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome, *Reproductive BioMedicine Online*. 2004 Jul; 9(1): s. 74 – 78.
27. **Schlegel P. N., Girardi S. K.:** Clinical review 87: In vitro fertilization for male factor infertility, *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Mar; 82(3): s. 709-16.
28. **Tesařík J., Greco E.:** The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology, *Human Reproduction*. 1999 May; 14(5): s. 1318-1323.
29. **VACEK Z.:** Embryologie – učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka, Grada Publishing a. s., 2006, 256 s.
30. **Veeck L. L., Zaninovič N.:** An Atlas of Human blastocyst, Parthenon Publishing Group, 2003, 285 s.
31. **Žáková J., Ventruba P., Crha I., Lousová E., Sochorová K., Pohanka M., Huser M.:** Nové metody zvyšující úspěšnost asistované reprodukce, *Čes. Gynék*. 2012, 77, č. 2, s. 139-142.
32. (URL 1) dostupné na: www.Auxogyn.com
33. (URL 2) dostupné na: www.FertiliTech.com
34. (URL 3) dostupné na: www.Vitrolife.com/en/Fertility