

Meiotické vřeténko jako marker optimálního času pro vitrifikaci oocytů – případ úspěšné léčby neplodnosti a přehled literatury

Meiotic spindle as a marker of optimal time for oocyte vitrification – presentation of successful infertility treatment and literature review

J. Mašata¹, O. Teplá¹, S. Jirsová¹, A. Pšeničková¹, M. Moosová¹, E. Fajmonová¹, I. Kratochvilová²

¹ Centrum asistované reprodukce, Klinika gynekologie, porodnictví a neonatologie 1. LF UK a VFN v Praze

² Fyzikální ústav, AV ČR, Praha

Souhrn: **Cíl:** V rámci procesu *in vitro* fertilizace (IVF) zhodnotit možnost použití stavu meiotického vřeténka jako indikátoru zralosti oocytů za účelem optimalizace načasování vitrifikace. **Pacienti a metody:** V rámci léčby neplodnosti 38leté ženy a 43letého muže metodou IVF-ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie) byla zobrazena dělicí vřeténka jako markery zralosti oocytů před jejich vitrifikací z důvodu azoospermie u partnera. Oocyty, u nichž byl úhel mezi polárním tělískem a meiotickým vřeténkem $\leq 30^\circ$, případně měly špatně viditelné meiotické vřeténko, byly vitrifikovány 4 hod po vyhodnocení meiotického vřeténka (8 hod po odběru oocytů). Standardně jsou oocyty vitrifikovány 6 hod po odběru oocytů. **Výsledek:** Delší doba inkubace oocytů pacientky umožnila, aby oocyty před vitrifikací plně dozrály (do fáze MIII) a po rozmrazení byly připraveny pro oplodnění. U partnera pacientky byly následně získány vitální spermie po léčbě tamoxifenem, oocyty byly rozmrazeny a oplodněny získanými spermii, s následným embryotransferem a porodem zdravého dítěte v termínu. **Závěr:** Meiotické vřeténko je možné použít jako marker plné zralosti u oocytů před jejich vitrifikací u starších žen. Po rozmrazení byly oocyty zralé a připravené pro oplodnění metodou ICSI.

Klíčová slova: oocyt – meiotické vřeténko – polární tělíčko – IVF – gravidita

Summary: **Aim:** Within the *in vitro* fertilization (IVF) process, to evaluate the possibility of using the state of the meiotic spindle of oocytes as an indicator of maturity in order to optimize the timing of vitrification. **Patients and methods:** In the presented report, the cause of couple infertility was a combination of a 38-year-old female and 43-year-old male with azoospermia, which was an indication for oocyte vitrification. Oocyte polar bodies and optically birefringent meiotic spindles were visualized by polarized light microscopy and their states and relative positions were used as indicators of oocyte maturation, i.e. readiness for vitrification. Oocytes which had an angle between the polar body and meiotic spindle $\alpha \leq 30^\circ$ or had a poorly visible meiotic spindle were vitrified 4 hours post-meiotic spindle evaluation (8 hours after ovum pick-up). **Results:** After thawing, oocytes were fully matured and prepared for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Following treatment with tamoxifen, vital sperm were retrieved from the patient's partner, the oocytes were thawed and fertilized with the obtained sperm, with subsequent embryo transfer and delivery of a healthy baby at term. **Conclusion:** The meiotic spindle can be used as an oocyte maturation pointer in older women. After thawing, the oocytes were fully matured and ready for fertilization by ICSI.

Key words: oocyte – meiotic spindle – polar body – IVF – pregnancy

Úvod

Oocyty mají zásadní vliv na kvalitu embrya, a tedy i na výsledky oplodnění metodou *in vitro* fertilizace (IVF). Nezralost oocytů je jedním z možných důvodů špatných výsledků oplození vitrifikovaných a rozmražených oocytů metodu

ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie) u starších žen > 35 let [1–3]. Kvalita a zralost oocytu ovlivňuje nejen jaderný a mitochondriální genom, ale také mikroprostředí ve vaječniku a preovulační folikulu, které ovlivňují transkripci a translaci, a v důsledku toho i zralost oocytu.

Po odstranění cumulus oophorus vč. buněk corona radiata je hodnocení kvality a zralosti oocytů přesnější. Vychází ze stavu jaderné zralosti, morfologie cytoplazmy a vzhledu extracytoplazmatických struktur. Standardní optickou mikroskopií snadno zjistitelné první polární

tělisko je obecně považováno za marker zralosti oocytů [1–5]. Samotná přítomnost polárního tělíska nemusí být však pro identifikaci zralosti oocytu dostatečná, a to vzhledem ke skutečnosti, že některé oocyty s viditelným polárním tělískem mohou být ve stadiích telofáze I, příp. profáze II (interfáze mezi prvním a druhým meiotickým dělením). Konečná metafáze II (MII) oocytu je charakterizována definovaným srovnáním chromozomů do ekvatoriální roviny meiotického vřeténka. Meiotické vřeténko jako mikrotubulární struktura podílející se na segregaci chromozomů je tedy rozhodující pro správné dokončení meiózy a pro následnou úspěšnou fertilizaci. Pokud se nám v rámci procesu IVF podaří zobrazit kromě polárního tělíska i meiotické vřeténko, získáme velmi komplexní informaci o stavu zralosti oocytů [5–12].

Paralelně uspořádané mikrotubuly meiotického vřeténka jsou dvojlomné, což umožňuje snadno zobrazit meiotické vřeténko optickým polarizačním mikroskopem. Látky dvojlomné totiž polarizované světlo v mikroskopu rozdělí na dva paprsky – řádný a mimořádný. Ty jsou oproti sobě fázově posunuté. Po průchodu analyzátozem dochází k interferenci (skládání) těchto dvou paprsků do stejné roviny kmitu a obraz objektu se nám pak jeví jako světlý na tmavém pozadí (resp. při použití bílého, tedy složeného světla – barevný na tmavém pozadí).

Kazuistika popisuje úspěšnou léčbu neplodnosti 38leté ženy a 43letého muže metodou oplodnění IVF, při níž jsme zobrazením dělicích vřetének upřesnili stupeň zralosti oocytů a upravili dobu inkubace oocytů před jejich zamražením (indikací k zamražení byla azoospermie partnera po odběru oocytů). Oocyty, u nichž byl úhel mezi polárním tělískem a meiotickým vřeténkem $\leq 30^\circ$, případně měly špatně viditelné meiotické vřeténko, byly inkubovány a následně vitrifikovány až 8 hod po odběru oocytů. Oocyty s dobře viditelným meiotickým vřeténkem, u nichž

byl úhel mezi polárním tělískem a meiotickým vřeténkem $\leq 30^\circ$ jsou běžně inkubovány (následně vitrifikovány) 6 hod po odběru oocytu. Meiotická vřeténka byla vizualizována optickým mikroskopem s polarizačním filtrem [6,7].

Kazuistika

V Centru asistované reprodukce Kliniky gynekologie, porodnictví a neonatologie 1. LF UK a VFN v Praze byla v roce 2019 vyšetřena 38letá žena kavkazského původu (G0/P0, index tělesné hmotnosti: 22,5 kg/m²) a její manžel pro 2 roky trvající primární neplodnost páru. V osobní anamnéze neměla žádné závažné onemocnění, nebyla operována a neužívala žádné léky – menarché ve 12 letech, antikoncepci užívala 15 let, po vysazení pravidelný 26denní menstruační cyklus. Při ultrazvukovém vyšetření byla zjištěna nízká ovariální rezerva, což jsme potvrdili laboratorním vyšetřením (FSH 2. den 8,11 IU/l, AMH 0,6 ng/ml). Partner pacientky byl 43letý muž kavkazské národnosti, který v anamnéze neměl žádnou nadměrnou konzumaci alkoholu, nebyl vystaven působení toxických látek a nebyl trvale léčen. Neměl žádné genitální onemocnění, varikokélu ani poranění varlat. Při prvním spermioqramu byla zjištěna těžká nekrozoospermie, v nativním spermatu nebyly žádné živé spermie, ale při kontrolním spermioqramu o 2 měsíce později byly nalezeny živé spermie, malý počet oddělených spermií (OTA – oligoathenoteratozoospermie). Dostupnými vyšetřovacími metodami nebyla zjištěna žádná dostupná imunologická a genetická příčina pacientovy neplodnosti. Pár se rozhodl podstoupit cyklus IVF/ICSI jako léčbu první volby.

Dne 24. ledna 2021 proběhl první cyklus IVF léčené pacientky (byl použit krátký protokol rFSH 300 IU + antagonist). Nakonec byly odebrány dva oocyty. Pro oplodnění nebyly k dispozici žádné vitální spermie a partneři odmítli použití dárcovských spermií. Vzhledem k tomu, že pacientce bylo 38 let a nebyly získány

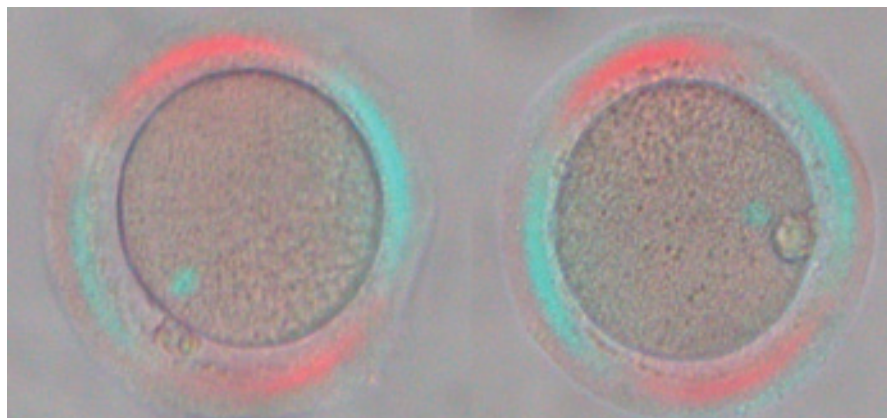
vhodné spermie k oplození oocytů, bylo pro optimalizaci načasování vitrifikace oocytů a zpřesnění jejich zralosti použito zobrazení meiotického vřeténka v polarizovaném světle (mikroskop s polarizačním filtrem Nikon CEE GmbH). V jednom případě bylo vřeténko sotva viditelné, v druhém jsme meiotické vřeténko neviděli. Šest hodin po vyhodnocení meiotického vřeténka (8 hod po odběru) byly oba oocyty kryokonzervovány vitrifikací (oocyty, které mají úhel α mezi polárním tělískem a meiotickým vřeténkem $\leq 30^\circ$ nebo mají špatně viditelné meiotické vřeténko, jsou vitrifikovány 4 hod po vyhodnocení meiotického vřeténka – 8 hod po odběru oocytů). Standardně se oocyty vitrifikuji 6 hod po odběru. V našem případě delší doba inkubace umožnila, aby oocyty před vitrifikací plně dozrály (fáze MII) a po rozmrazení byly plně připraveny pro oplodnění metodou ICSI [8].

V dalším cyklu (stejný stimulační protokol) byly opět odebrány dva zralé oocyty (po kontrole stavu dělicích vřetének) vitrifikovány a opět nebyly k dispozici žádné spermie. Fotografie oocytů s vřeténky v proximální poloze vůči polárnímu tělísku z mikroskopu Nikon Eclipse Ti2 Series jsou prezentovány na obr. 1.

Partner pacientky byl následně léčen tamoxifenem tbl. 1-0-0 s následným zlepšením spermioqramu. V den plánovaného rozmrazení oocytů partner odevzdal čerstvý vzorek spermatu v 9:10 hod, kde byly přítomny vitální spermie, následně jsme rozmrazili čtyři oocyty (zralost oocytů opět upřesněna zobrazením meiotického vřeténka v polarizovaném světle). Téhož dne v 11:30 hod byly oocyty oplodněny metodou ICSI. Vývoj dvou embryí se zastavil 3. den, následoval transfer embryí 8/1 gr. 1, s graviditou a porodem zdravého dítěte v termínu.

Diskuze

V prezentované kazuistice byla v rámci léčby neplodnosti 38leté ženy a 43letého muže metodou IVF použita dělicí



Obr. 1. Nezralost oocytů indikovaná blízkostí meiotického vřeténka a polárního tělíska zachycená polarizovaným světelným mikroskopem Nikon Eclipse Ti2 Series.

Fig. 1. Oocyte immaturity indicated by the proximity of the meiotic spindle and polar body captured by a Nikon Eclipse Ti2 Series polarized light microscope.

vřeténka jako markery zralosti oocytů před jejich vitrifikací. Pacientka měla nízkou ovariální rezervu, takže jsme předpokládali, že nižší kvalita oocytů snižuje pravděpodobnost jejich úspěšného oplodnění po vitrifikaci a rozmrazení. Pro zvýšení pravděpodobnosti klinické gravidity pacientky byla polarizačním světelným mikroskopem vizualizována opticky dvojlomná meiotická vřeténka a jejich stav a relativní poloha vůči polárním tělískům byly použity jako indikátory zralosti oocytů před jejich vitrifikací [9–17].

Nedávné studie využívající polarizovanou světelnou mikroskopii ukázaly, že oocyty, na nichž je patrné první polární tělísko, mohou být stále nezralé (v raném stadiu telofáze I [11,16,17]), přestože je polární tělísko přítomno v perivitellinním prostoru. Předpokládá se, že přítomnost a poloha meiotického vřeténka souvisí

s vývojovou kompetencí oocytu [3,11]. Studie Rienzi et al. [3,11,16,17] ukázala, že není důležitá pouze přítomnost dvojlomného meiotického vřeténka, ale pro úspěšné oplodnění hraje roli také poloha meiotického vřeténka vzhledem k umístění prvního polárního tělíska v době ICSI.

Vzhledem k tomu, že oocyty naší pacientky s polárním tělískem a meiotickým vřeténkem v těsné blízkosti mohly být nedostatečně zralé, upravili jsme načasování vitrifikace jak podle relativní polohy polárního tělíska a meiotického vřeténka, tak podle stavu meiotického vřeténka. Pozdější vytvoření meiotického vřeténka lze vysvětlit tím, že při nepřítomnosti centrozomu je nukleace mikrotubulů pomalá a může trvat několik hodin, než se po vzniku polárního tělíska vytvoří bipolární MII vřeténko [5].

Oocyty, které měly úhel mezi polárním tělískem a meiotickým vřeténkem $\alpha \leq 30^\circ$, byly vitrifikovány 4 hod po vyhodnocení meiotického vřeténka (8 hod po odběru oocytů). Při standardních postupech se oocyty vitrifikují 6 hod po odběru.

Závěr

Meiotické vřeténko je možné použít jako marker plné zralosti u oocytů před vitrifikací u starších žen. Modifikace doby inkubace oocytů dle stavu meiotického vřeténka umožnila, aby oocyty před vitrifikací plně dozrály (fáze MII) a po rozmrazení byly plně připravené pro oplodnění metodou ICSI.

Literatura

- Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 2008; 14(5): 431–446. doi: 10.1093/humupd/dmn025.
- Holubcova Z, Kyjovska D, Martonova M et al. Human egg maturity assessment and its clinical application. *J Vis Exp* 2019; 150. doi: 10.3791/60058.
- Rienzi L, Balaban B, Ebner T et al. The oocyte. *Hum Reprod* 2012; 27(Suppl 1): i2–i21. doi: 10.1093/humrep/des200.
- Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997; 12(8): 1750–1755. doi: 10.1093/humrep/12.8.1750.
- Tepla O, Topurko Z, Jirsova S et al. Timing of ICSI with respect to meiotic spindle status. *Int J Mol Sci* 2023; 24(1): 105. doi: 10.3390/ijms24010105.
- Konc J, Kanyó K, Kriston R et al. Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 307268. doi: 10.1155/2014/307268.
- Peinado I, Moya I, Sáez-Espinosa P et al. Impact of maturation and vitrification time of

Publikační etika: Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

Publication ethics: The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE uniform requirements for biomedical papers.

Konflikt zájmů: Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie/práce nemají žádný konflikt zájmů.

Conflict of interests: The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning the drugs, products or services used in the study.

Dedikace: Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR, grant AZV č. NW24-08-00048 a interního grantu 1. LF a VFN Zobrazování meiotického vřeténka u výkonů asistované reprodukce MZ-ČR-RVO-VFN00064165.

Dedikace: This work was supported by The Ministry of Health of the Czech Republic, AZV grant nr. NW24-08-00048 and the 1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital internal support of the project Imaging of the meiotic spindle in assisted reproduction procedures MZ-ČR-RVO-VFN00064165.

human GV oocytes on the metaphase plate configuration. *Int J Mol Sci* 2021; 22(3): 1125. doi: 10.3390/ijms22031125.

8. Teplá O, Topurko Z, Mašata J et al. Important parameters affecting quality of vitrified donor oocytes. *Cryobiology* 2021; 100: 110–116. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.03.001.

9. Boldt J. Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte. *Reprod Biomed Online* 2011; 23(3): 314–322. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.11.019.

10. Mohsenzadeh M, Salehi-Abargouei A, Tabibnejad N et al. Effect of vitrification on human oocyte maturation rate during *in vitro* maturation procedure: a systematic review and meta-analysis. *Cryobiology* 2018; 83: 84–89. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.05.003.

11. Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F et al. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004; 19(3): 655–659. doi: 10.1093/humrep/deh101.

12. Tomari H, Honjo K, Kunitake K et al. Meiotic spindle size is a strong indicator of human oo-

cyte quality. *Reprod Med Biol* 2018; 17(3): 268–274. doi: 10.1002/rmb2.12100.

13. Malickova K, Jarosová R, Rezabek K et al. Concentrations of sRAGE in serum and follicular fluid in assisted reproductive cycles – a preliminary study. *Clin Lab* 2010; 56(9–10): 377–384.

14. Kumherová M, Veselá K, Kosová M et al. Novel potential probiotic lactobacilli for prevention and treatment of vulvovaginal infections. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2021; 13(1): 163–172. doi: 10.1007/s12602-020-09675-2.

15. Tepla O, Peknicova J, Koci K et al. Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertil Steril* 2006; 86(1): 113–120. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.12.019.

16. Reinzi L, Ubaldi F, Martinez F et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18(6): 1289–1293. doi: 10.1093/humrep/deg274.

17. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M et al. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 10(2): 192–198. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60940-6.

ORCID autorů

J. Mašata 0000-0002-3898-6608

S. Jirsová 0000-0001-8891-8737

I. Kratochvilová 0000-0002-6633-9432

Doručeno/Submitted: 24. 9. 2024

Přijato/Accepted: 10. 10. 2024

prof. MUDr. Jaromír Mašata, CSc.

Centrum asistované reprodukce

Klinika gynekologie, porodnictví

a neonatologie

1. LF UK a VFN v Praze

Apolinářská 18

120 00 Praha 2

Jaromir.Masata@vfn.cz

XXXI. KONGRES
Slovenskej gynekologicko-pôrodníckej spoločnosti SLS

15. – 17. 5. 2025
DOM UMENIA, Košice

www.sgps.sk
www.sgps-kongres.sk

SK SaPA
Slovenská komora sestier a pôrodných asistentiek