

# Asistovaná aktivace oocytů

## Assisted oocyte activation

P. Trávník<sup>1-3</sup>, M. Jeřeta<sup>1,4,5</sup>, R. Hüttelová<sup>1,6</sup>, R. Křen<sup>1,7</sup>, L. Landsmann<sup>1,8</sup>, A. Nesvadbová<sup>1,9,10</sup>, G. Tauwinklová<sup>1,2,11</sup>

<sup>1</sup> Výbor Asociace reprodukční embryologie z.s.

<sup>2</sup> REPROMEDA s.r.o., Brno

<sup>3</sup> IPVZ, Praha

<sup>4</sup> Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno

<sup>5</sup> FAPPZ ČZU, Praha

<sup>6</sup> IVF CUBE SE, Praha

<sup>7</sup> Gennet s.r.o., Praha

<sup>8</sup> UNICA Prague s.r.o., Praha

<sup>9</sup> IVF Clinic a.s., Olomouc

<sup>10</sup> Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc

<sup>11</sup> Ústav histologie a embryologie, LF MU, Brno

**Souhrn:** **Cíl:** V současné době rychle přibývá nových studií o asistované aktivaci oocytů, která může výrazně zefektivnit celý proces *in vitro* fertilizace. Oplození oocytů konvenční metodou i pomocí intracytoplazmatické injekce spermií může selhat z důvodu nedostatečné aktivace oocyty. Důvodem bývají zejména odchylky v enzymovém vybavení spermií nebo oocytů či nefunkční aktivací kaskáda. V řadě případů lze oplození dosáhnout užitím umělé aktivace oocytů pomocí aplikace donorů vápníkových iontů na oocyty po mikroinjekci spermií. Názory na bezpečnost a spolehlivost této metody však nejsou jednotné. Cílem práce je prezentovat současné poznatky o asistované aktivaci oocytů a o jejím dopadu nejen na *in vitro* fertilizaci, ale také na následný embryonální a fetální vývoj. **Metodika:** Rešerše relevantní literatury v databázích Web of Science, Scopus a PubMed/Medline. **Výsledky a závěr:** Z literárních údajů i vlastních zkušeností autorů vyplývá, že je tato metoda účinná a z hlediska dalšího vývoje embrya, plodu i postnatálního vývoje bezpečná. Byly provedeny rozsáhlé metaanalýzy zaměřené na tuto metodu, které nezjistily negativní dopad nejen na embryonální a fetální vývoj jedince, ale tato metoda neměla negativní dopad ani na psychosomatický vývoj narozených dětí.

**Klíčová slova:** oocyt – embryo – *in vitro* fertilizace – umělá aktivace oocytů – spermie

**Summary:** **Objective:** Currently, there is a rapid increase in studies on assisted oocyte activation, which can significantly improve the process of *in vitro* fertilization. Fertilization of oocytes by conventional methods and by intracytoplasmic sperm injection can be affected by insufficient activation of the oocyte. The reason is mainly deviations in the enzymatic equipment of sperm or oocytes or a non-functional activation cascade. In many cases, fertilization can be achieved using artificial oocyte activation by applying calcium ion donors to the oocytes after sperm microinjection. However, opinions on the safety and reliability of this method are not uniform. The aim of the thesis is to present current knowledge about assisted oocyte activation and its impact not only on *in vitro* fertilization, but also on subsequent embryonic and fetal development. **Methodology:** Research of relevant literature in Web of Science, PubMed/Medline and Scopus databases. **Results and conclusions:** Based on the literature data and the authors' own experience, it follows that this method is effective and safe from the point of view of further development of the embryo, fetus and postnatal development. Extensive meta-analyses focused on this method were carried out, which did not find a negative impact not only on the embryonic and fetal development of the individual, but this method did not have associated with a negative impact on the psychosomatic development of the children.

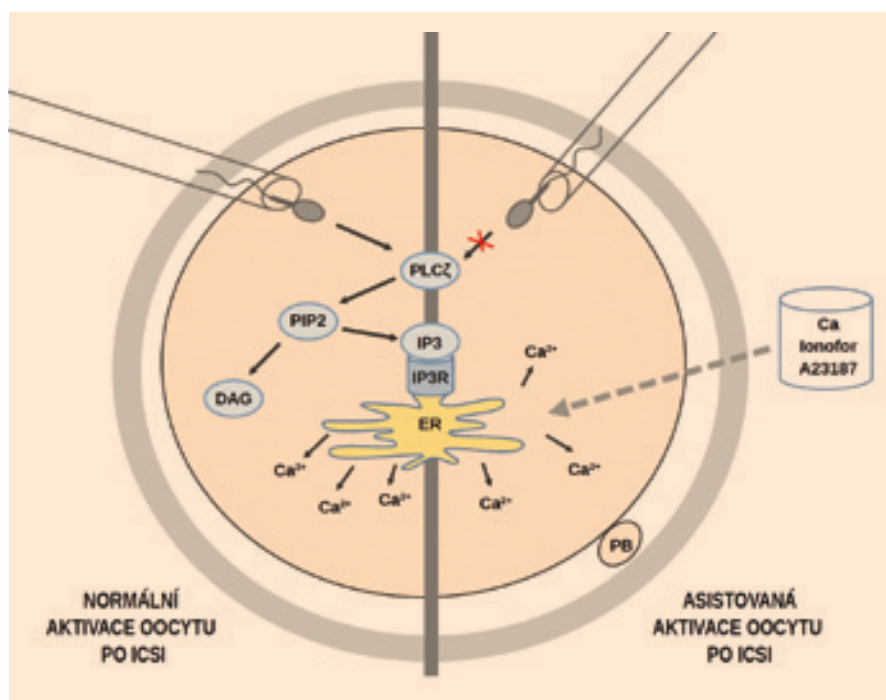
**Key words:** oocyte – *in vitro* fertilization – embryo – artificial oocyte activation – spermatozoa

### Úvod

Intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI) je nejúspěšnější metodou léčby mužského faktoru neplodnosti, prakticky nezávislou na parametrech spermií. Se-

lhaní fertilizace u neplodných párů po ICSI nastává u 1–3 % párů [1]. Toto selhání fertilizace nastává v důsledku neúspěšné aktivace oocytů, jejíž původ může být jak ve spermiích, tak i v oocytech [2].

Asistovaná aktivace oocytů (AOA – assisted oocyte activation) byla postupně aplikována v lidské asistované reprodukci k obnově fertilizace u párů s historií selhání fertilizace [1]. Nejuží-



**Obr. 1.** Na obrázku je znázorněn oocyt v metafázi I s jedním pólovým tělískem (PB).

Při normální aktivaci oocytu se ze spermie vpravené do oocytu uvolní fosfolipáza C $\zeta$  (PLC $\zeta$ ), která štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na diacylglycerol (DAG) a inositol-1,3,5-trisfosfát (IP3). IP3 se váže na receptor (IP3R), což uvolní z endoplazmatického retikula (ER) vápníkové ionty (Ca<sup>2+</sup>), které oocyt aktivují. Při umělé aktivaci, kde chybí fosfolipáza C $\zeta$ , jsou kalciové ionty uvolněny pomocí dodaného donátoru kalcia, např. vápníkového ionoforu A23187 (Ca ionofor A23187).

Fig. 1. The figure shows an oocyte in metaphase I with one polar body (PB).

During normal oocyte activation, phospholipase C $\zeta$  (PLC $\zeta$ ) is released from sperm injected into the oocyte, which splits phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) into diacylglycerol (DAG) and inositol-1,3,5-trisphosphate (IP3). IP3 binds to a receptor (IP3R), which releases calcium ions (Ca<sup>2+</sup>) from the endoplasmic reticulum (ER) to activate the oocyte. In artificial activation where phospholipase C $\zeta$  is absent, calcium ions are released using a supplied calcium donor, for example calcium ionophore A23187 (Ca ionophore A23187).

vanější metodou je aktivace pomocí donorů vápníkových iontů (Ca ionoforu A23187 nebo ionomycinu) krátce po provedení ICSI. První dítě se narodilo po jejím použití v kombinaci s ICSI v roce 1995 [3].

Použití kalciových ionoforů vede ke statisticky významnému zlepšení fertilizace s úspěšnou blastulací, implantací, otěhotněním a porodem živých dětí, což dokládá významně pozitivní vliv použití kalciových ionoforů [4].

Byl studován vliv AOA na expresi genů, která se nelišila od exprese genů po *in vitro* fertilizaci (IVF) a ICSI [5,6].

Nebyl prokázán významný rozdíl mezi typem a frekvencí chromozomových aberací a malformací ve srovnání mezi skupinami, kde bylo provedeno ICSI bez aktivace, nebo s aktivací [7]. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly týkající se porodní hmotnosti, termínu porodu a pohlaví dítěte [8]. Neonatologické charakteristiky a neuropsychický vývoj dětí ve věku 3–10 let počatých pomocí asistované aktivace oocytů byl normální [1]. Účinky této metody na lidská embrya jsou pečlivě sledovány a předpoklad, že použití AOA bude spojeno se změnami genové exprese, se v zásadě nepotvrdil.

Ve srovnání konvenční IVF a kombinace ICSI s AOA byla genová exprese po AOA překvapivě blíže klasickému IVF než samotnému ICSI [5].

Bezpečnost z hlediska možného vzniku vrozených vad prokázala řada dalších publikací [9–12]. V roce 2022 byla zveřejněna rozsáhlá metaanalýza zaměřená na hodnocení aktivace lidských oocytů kalciovým ionoforem. Tato práce zahrnuje 22 studií a zkoumala především účinnost a bezpečnost AOA s kalciovým ionoforem. Výsledky ukázaly, že AOA s kalciovým ionoforem nejenže významně zvýšila efektivitu fertilizace, blastulaci, implantaci, klinické těhotenství a počet živě narozených dětí, ale také neovlivnila výskyt potratů, vrozených vad a poměr pohlaví novorozenců [13]. Při sledování výsledků analýz PGT-A byla porovnáována skupina embryí vzniklých po ICSI a embryí, kdy byla společně s metodou ICSI použita i metoda AOA. Bylo zjištěno, že použití kalciového ionoforu (jako aktivátoru pro AOA) nezhoršilo časný embryonální vývoj a nezpůsobilo zvýšení podílu embryí s aneuploidii [7].

Možné obavy z epigenetických modifikací v důsledku asistované aktivace oocytů nebyly v praxi potvrzeny, navíc v průběhu časného embryonálního vývoje dochází k reprogramování genomu [14] a případné chyby v epigenetické informaci na stadiu gamet a zygoty by byly během reprogramování odstraněny.

Aktivace oocytů ionoforem je považována za legitimní možnost pro páry se selháním fertilizace [8].

### Mechanismus přirozené aktivace oocytu

Normální spermie uvolní fosfolipázu C zeta (PLC $\zeta$ ) do cytoplazmy oocytu (obr. 1). Ta hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). IP3 potom stimuluje uvolnění kalciových iontů z endoplazmatického retikula oocytu do cytoplazmy a vyvolá oscilace

koncentrace kalciových iontů. Zvýšená hladina vápníkových iontů v cytoplazmě je důležitá pro aktivaci Ca dependentních kináz nezbytných pro prolomení meiotického bloku, vydělení druhého pólového tělíska a následnou aktivaci oocyty [15]. Pokud spermie neobsahuje dostatečnou koncentraci PLC $\zeta$  nebo není schopna aktivovat Ca dependentní signální dráhu, k aktivaci oocyty a k vývoji zygoty nedojde.

### Mechanismus asistované aktivace oocyty

Na rozdíl od přirozené aktivace, tedy při AOA, není navozena oscilace kalciových iontů, ale je indukován jeden influx vápníkových iontů (obr. 1). Ten je dostatečný pro aktivaci Ca dependentní signální dráhy vedoucí k efektu na Ca/kalmodulin dependentní protein-kinázy II (CAMKII). Lidské oocyty mohou tedy reagovat na široké rozpětí změn intracelulárního CA<sup>2+</sup> a mají vysoký stupeň tolerance ke změnám koncentrace vápníku v cytosolu.

### Indikace

Indikací pro primární provedení aktivace oocytů je buď empiricky zjištěné selhání fertilizace v předchozích pokusech o oplození pomocí ICSI, nebo oprávněný předpoklad, že k aktivaci oocyty nedojde z biologických příčin daných zjištěnými vadami spermii nebo oocytů. Je to např. identifikace alespoň jedné potenciálně patogenní varianty v genu PLC $\zeta$ 1 v gDNA spermie po selhání fertilizace v předchozím cyklu ICSI [16].

Další indikací je použití intracytoplazmatické injekce kulatých spermatid (ROSI) získaných chirurgickým výkonem z varlat (TESA, TESE). Spermatidy nejsou schopny oocyt aktivovat, a proto je tato metoda nezbytná [17]. Aktivace oocytů může zlepšit podíl oplozených oocytů i tam, kde po TESE elongovaných spermatid/spermii v předchozích cyklech fertilizace selhala [18].

Další indikací je oplození spermii muži s globozoospermii. Spermie pa-

cientů s globozoospermii buď vůbec nemají, nebo mají výrazně snížený obsah klíčového aktivačního faktoru – PLC $\zeta$  [19]. Efektivita metody ICSI je u těchto pacientů velice nízká a použití této metody je často jediným řešením neúspěšné fertilizace [20].

Metoda byla rovněž aplikována při použití spermii mužů s Kartagenerovým syndromem, kde bez použití aktivace nedošlo k oplození po intracytoplazmatické injekci spermii, kdežto při použití aktivace byly oocyty těmito spermii oplozeny [21].

Vedle primárního provedení aktivace oocytů byla publikována i metoda záchranné aktivace oocytů (RAOA – rescue assisted oocyte activation), indikovaná v případech neočekávaného úplného selhání fertilizace bez primárního provedení asistované aktivace [22,23]. U této techniky je ale důležité vhodně zvolit čas, kdy po neúspěšném ICSI použít RAOA. Pokud by RAOA proběhlo příliš brzy, může to být zbytečné, a naopak to může narušit normální vývoj prvojader. Pokud by to bylo příliš pozdě, může již dojít ke stárnutí oocyty a je riziko, že celý proces selže.

### Metodika

K provedení asistované aktivace je vhodné použít komerčního aktivačního média s ionoforem A23187 (GM508 Cult-Active Gynemed), případně jiného aktivačního média dodávaného pro účely aktivace lidských oocytů.

Pokud je k aktivaci používán preparát GM508 Cultactive, je postup následující [24]:

1. Roztok ionoforu je intenzivně protřepán po dobu 30 s.
2. Následuje ekvilibrace při 37 °C v atmosféře používané ke kultivaci embryí po dobu 4 hod.
3. Pro každý oocyt je připravena kapka obsahující 30  $\mu$ l roztoku ionoforu a 60  $\mu$ l kultivačního média neobsahujícího HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) ani MOPS (3-(N-morpholino)propansul-

fonová kyselina). Kapky jsou kryty minerálním olejem.

4. Bezprostředně po provedení intracytoplazmatické injekce spermie jsou oocyty inkubovány po jednom v těchto kapkách po dobu 15 min.
5. Po skončení inkubace jsou oocyty opláchnuty 2krát v kultivačním médiu neobsahujícím MOPS ani HEPES.
6. Poté jsou oocyty kultivovány obvyklým způsobem.
7. Výsledek oplození je vyhodnocen dektékci dvou prvojader a dvou pólocytů po 18 hod kultivace.

Pokud je používán jiný přípravek určený k aktivaci oocytů, je třeba se řídit návodem výrobce.

Záchranná aktivace oocytů (RAOA) je prováděna v případě, že nedošlo k očekávanému oplození oocytů. K vydělení druhého pólového tělíska dochází nejčastěji mezi 2 a 3 hod po ICSI. Pokud tedy po více než 3 hod od ICSI stále není vydělené druhé pólové tělíska, může mít pozitivní efekt RAOA, které by ovšem nemělo být provedeno později než za 6 hod od ICSI [25].

Pokud dojde k aktivaci, je třeba u RAOA počítat s posunem vývoje zygot, proto nejsou vzniklá embrya vhodná k čerstvému transferu a vždy mají být vitrifikována.

### Závěr

Metoda AOA je celosvětově používaná metoda asistované reprodukce. Je založena na principu aktivace oocytů pomocí vápníkových iontů. Tato metoda se používá dlouhodobě a dosud publikované studie nezjistily negativní vliv této metody na embryonální vývoj lidských embryí, podíl chromozomových aberací či zdravotní stav narozených dětí.

### Literatura

1. Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, Heindryckx B et al. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reprod Biomed Online* 2014; 28(5): 560–571. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.01.008.
2. Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F et al. Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique

- to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril* 2002; 78(3): 619–624. doi: 10.1016/s0015-0282(02)03291-0.
3. Hoshi K, Yanagida K, Yazawa H et al. Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon. *Fertil Steril* 1995; 63(6): 1241–1245. doi: 10.1016/0020-7292(96)88083-0.
4. Murugesu S, Saso S, Jones BP et al. Does the use of calcium ionophore during artificial oocyte activation demonstrate an effect on pregnancy rate? A meta-analysis. *Fertil Steril* 2017; 108(3): 468.e3–482.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.029.
5. Bridges PJ, Jeoung M, Kim H et al. Methodology matters: IVF versus ICSI and embryonic gene expression. *Reprod Biomed Online* 2011; 23(2): 234–244. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.04.007.
6. Ferrer-Buitrago M, Tilleman L, Thys V et al. Comparative study of preimplantation development following distinct assisted oocyte activation protocols in a PLC-zeta knockout mouse model. *Mol Hum Reprod* 2020; 26(11): 801–815. doi: 10.1093/molehr/gaaa060.
7. Zhang J, Yao G, Zhang T et al. Effect of calcium ionophore (A23187) on embryo development and its safety in PGT cycles. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023; 13: 979248. doi: 10.3389/fendo.2022.979248.
8. Miller N, Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R et al. Oocyte activation by calcium ionophore and congenital birth defects: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2016; 106(3): 590.e2–596.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.04.025.
9. Yoon HJ, Bae IH, Kim HJ et al. Analysis of clinical outcomes with respect to spermatozoan origin after artificial oocyte activation with a calcium ionophore. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(12): 1569–1575. doi: 10.1007/s10815-013-0110-2.
10. Deemeh MR, Tavalae M, Nasr-Esfahani MH. Health of children born through artificial oocyte activation: a pilot study. *Reprod Sci* 2015; 22(3): 322–328. doi: 10.1177/1933719114542017.
11. Li B, Zhou Y, Yan Z et al. Pregnancy and neonatal outcomes of artificial oocyte activation in patients undergoing frozen-thawed embryo transfer: a 6-year population-based retrospective study. *Arch Gynecol Obstet* 2019; 300(4): 1083–1092. doi: 10.1007/s00404-019-05298-3.
12. Long R, Wang M, Yang QY et al. Risk of birth defects in children conceived by artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2020; 18(1): 123. doi: 10.1186/s12958-020-00680-2.
13. Shan Y, Zhao H, Zhao D et al. Assisted oocyte activation with calcium ionophore improves pregnancy outcomes and offspring safety in infertile patients: a systematic review and meta-analysis. *Front Physiol* 2022; 12: 751905. doi: 10.3389/fphys.2021.751905.
14. Morgan HD, Santos F, Green K et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14(1): R47–R58. doi: 10.1093/hmg/ddi114.
15. Zafar MI, Lu S, Li H. Sperm-oocyte interplay: an overview of spermatozoon's role in oocyte activation and current perspectives in diagnosis and fertility treatment. *Cell Biosci* 2021; 11(1): 4. doi: 10.1186/s13578-020-00520-1.
16. Martínez M, Durban M, Santaló J et al. Assisted oocyte activation effects on the morphokinetic pattern of derived embryos. *J Assist Reprod Genet* 2021; 38(2): 531–537. doi: 10.1007/s10815-020-02025-9.
17. Niu X, Ruan Q, Witz CA et al. Comparison of human oocyte activation between round-headed sperm injection followed by calcium ionophore treatment and normal sperm injection in a patient with globozoospermia. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11: 183. doi: 10.3389/fendo.2020.00183.
18. Kang HJ, Lee SH, Park YS et al. Artificial oocyte activation in intracytoplasmic sperm injection cycles using testicular sperm in human in vitro fertilization. *Clin Exp Reprod Med* 2015; 42(2): 45–50. doi: 10.5653/cerm.2015.42.2.45.
19. Alvarez Sedó C, Rawe VY, Chemes HE. Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Hum Reprod* 2012; 27(7): 1912–1921. doi: 10.1093/humrep/des126.
20. Bechoua S, Chiron A, Delclevé-Paulhac S et al. Fertilisation and pregnancy outcome after ICSI in globozoospermic patients without assisted oocyte activation. *Andrologia* 2009; 41(1): 55–58. doi: 10.1111/j.1439-0272.2008.00884.x.
21. Ebner T, Maurer M, Oppelt P et al. Healthy twin live-birth after ionophore treatment in a case of theophylline-resistant Kartagener syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32(6): 873–877. doi: 10.1007/s10815-015-0486-2.
22. Economou KA, Christopikou D, Tsorva E et al. The combination of calcium ionophore A23187 and GM-CSF can safely salvage aged human unfertilized oocytes after ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2017; 34(1): 33–41. doi: 10.1007/s10815-016-0823-0.
23. Xu Z, Yao G, Niu W et al. Calcium ionophore (A23187) rescues the activation of unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and chromosome analysis of blastocyst after activation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 12: 692082. doi: 10.3389/fendo.2021.692082.
24. Gebrauchsabweisung\_GM508\_CultActive\_Multi\_440X520\_55x65\_Rev01\_00.pdf. 2023 [online]. Available from: <https://gynemed.de/wp-content/uploads/2019/03>.
25. Shibahara T, Fukasaku Y, Hayashi N et al. Early rescue oocyte activation for activation-impaired oocytes with no second polar body extrusion after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2021; 38(5): 1061–1068. doi: 10.1007/s10815-021-02089-1.

#### ORCID autorů

P. Trávník 0000-0002-2966-923X  
 M. Jeřeta 0000-0003-1778-3454  
 R. Hüttelová 0009-0001-1877-1060  
 R. Křen 0009-0002-3534-7816  
 L. Landsmann 0000-0001-5984-1232  
 A. Nesvadbová 0000-0001-7854-4268  
 G. Tauwinklová 0009-0001-3024-6357

*Doručeno/Submitted: 22. 8. 2023*

*Přijato/Accepted: 1. 9. 2023*

*prof. MUDr. Pavel Trávník, DrSc.*

*REPROMEDA s.r.o.*

*Studentská 812/6*

*625 00 Brno*

*ptravnik@repromeda.cz*

**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.