

Vizualizácia deliaceho vretienka – moderná metóda v liečbe IVF

Pavel Svitok, Patrik Šranko, Gabriela Kaňová, Peter Harbulák

Nové technické prístupy sú základným predpokladom zvýšenia kvality poskytovanej zdravotnej starostlivosti. Základom je hľadať také postupy, ktoré zvyšujú šancu na úspešnú liečbu či zlepšia kvalitu diagnostiky bez negatívneho vplyvu na pacienta. Jedným z takýchto prístupov je aj vizualizácia deliaceho vretienka v oocytoch pomocou systému Oosight.

Kľúčové slová: oocyt, deliace vretienko, fertilizácia, Oosight

Visualization of the meiotic spindle - a modern method in the treatment of IVF

New technical approaches are necessary for increasing the quality of health care provided. The basis is to look for such procedures that increase the chance of successful treatment or improve the quality of diagnostics without negatively impacting the patient. One such approach is the visualization of the dividing spindle in oocytes using the Oosight system.

Keywords: oocyte, meiotic spindle, fertilization, Oosight

Gynekol. prax 2022; 20 (3): 149 – 151

Oogenéza

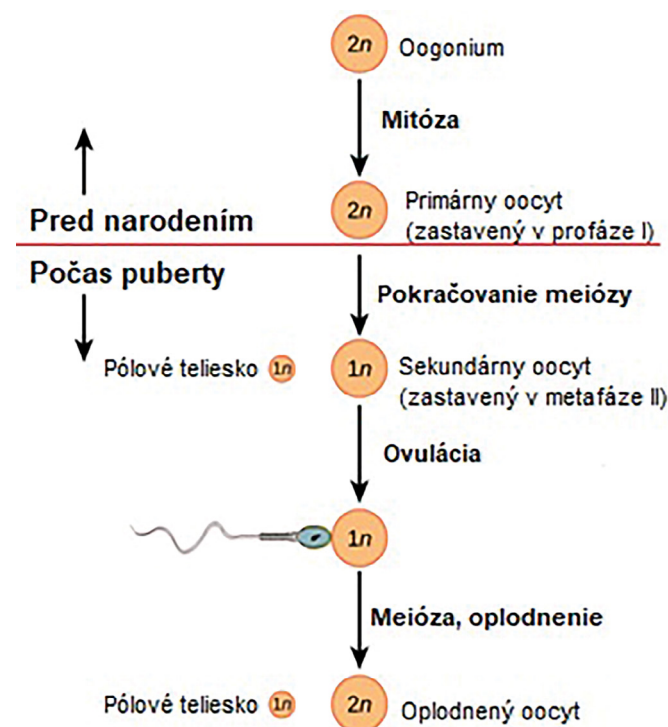
Díška reprodukčného života u žien je ovplyvnená počtom primordiálnych folikulov a ich prežitím počas celého života ženy. U vyvíjajúceho sa plodu je daná konečná populácia primordiálnych folikulov, ktoré podliehajú výraznému zániku už počas intrauterinného vývinu. V čase narodenia zostáva iba 20 % pôvodnej kohorty folikulov na udržanie schopnosti reprodukcie. Medzi narodením a pubertou vstupujú oocyty do zdĺhavej fázy, keď je ich vývin zastavený v štádiu profázy (**obrázok 1**). Niektoré bunky zostávajú v stave zastavenej meiotickej profázy až 50 rokov⁽¹⁾.

Je známe, že oocyt je jedinečná a vysokošpecializovaná bunka zodpovedná za vytváranie, aktiváciu a kontrolu embryonálneho genómu, ako aj za podporu základných procesov, ako je bunková homeostáza, metabolizmus a progresia bunkového cyklu v ranom embryu. Meióza v cicavčom oocyte sa iniciuje počas intrauterinného vývinu a je zastavená v diploténnom štádiu prvej meiotickej profázy. Vplyvom endogénneho luteinizačného hormónu sa meióza oocytov obnoví a postúpi do druhej meiotickej fázy. Ovuľácia vedie k uvoľneniu oocytu do vajcovodu, kde sa meióza zastaví v metafáze II (MII) až do oplodnenia. Pri oplodnení in vitro (IVF) a intracytoplazmatickej injekcii spermíí (ICSI) je výber oocytov založený na morfológických parametroch, ako je vzhľad kumulárnych buniek, morfológia pólneho telieska a vzhľad cytoplazmy⁽³⁾. Kvalita oocytov zostáva kľúčovým obmedzujúcim faktorom plodnosti žien, odráža vnútorný vývojový potenciál oocytov a má rozhodujúcu úlohu nielen pri oplodnení, ale aj pri ďalšom vývine embrya.

Dozrievanie oocytov sa skladá z dvoch samostatných procesov: jadrového a cytoplazmatického dozrievania, a to dobre koordinovaným a synchronizovaným spôsobom, aby sa zaručila primeraná kvalita oocytov. Jadrová zrelosť sa týka obnovenia meiózy a progresie do metafázy II, prirodzeného bodu zastavenia pred ovuláciou. Cytoplazmatické dozrievanie sa týka všetkých procesov, ktoré pripravujú oocyt na aktiváciu, adekvátne

oplodnenie, ako aj na ďalší embryonálny vývin. Oba typy dozrievania sú veľmi náchylné na poruchy hormonálneho zásobovania a kultivácie in vitro (napr. pH, teplota, kyslík), ktoré môžu spôsobiť zmeny v morfológii oocytov, pričom niektoré z týchto anomálií sú viditeľné aj na úrovni svetelnej mikroskopie. Najvýraznejším

Obrázok 1. Oogenéza: Proces oogenézy nastáva vo vonkajšej vrstve vaječníkov. Primárny oocyt začína prvé meiotické delenie, ktoré sa následne zastaví a pokračuje až v neskoršom veku, keď dokončí toto delenie vo vyvíjajúcom sa folikule. Výsledkom je sekundárny oocyt, ktorý po oplodnení dokončí meiózu^(upravené podľa 2).



Obr. 2: Maturácia oocytov: Štádiá zrelosti oocytov získaných pri ich odbere. Štádium s germinálnym vezikulom v profáze I (GV; A), štádium metafázy I (GVBD/MI; B), zrelý oocyt v štádiu metafázy II (MII, C)⁽⁶⁾.



parametrom na identifikáciu oocytov, ktoré neobnovili meiózu, je prítomnosť germinálneho vezikula profázy I (GV), ktorý identifikuje oocyty s diploidnou chromozómovou výbavou (46 chromozómov) (**obrázok 2 A**). Po rozpade germinálneho vezikula (GVBD) dosiahnu oocyty metafázu I (MI) (**obrázok 2 B**), ktorá je charakterizovaná absenciou extrúzie prvého pólového telieska. Aj keď niektoré z týchto oocytov môžu byť schopné oplodnenia, tvorba prvého pólového telieska (**obrázok 2 C**) je jediným prognostickým faktorom, ktorý umožňuje predpokladať, že gaméta dokončila jadrové dozrievanie⁽⁴⁾.

Deliace vretienko

Meiotické deliace vretienko (DV) je cytoskeletová štruktúra (**obrázok 3**), ktorá je kriticky dôležitá pre presnú distribúciu chromozómov do deliacich sa blastomér, čím je zabezpečený správny embryonálny vývin. V čerstvých oocytoch majú DV vertikálnu orientáciu vzhľadom na oolemmu a póly DV sú spojené s pericentriolárnymi materiálmi (PCM), aby vytvorili kompaktné bipolárne vretienko. Táto morfológia sa postupne v štádiu MII mení; vretienko sa predĺži a/alebo stratí napätie vo svojich mikrotubuloch a stáva sa krehkým⁽³⁾.

Morfológia DV je dôležitým indikátorom stavu oocytov. Molekulárne mechanizmy podmieňujúce vznik DV v čerstvých oocytoch poukazujú na ich dôležitosť pri oplodnení a embryonálnom vývine. Vretenový aparát v meiotických bunkách je zodpovedný za separáciu homologických chromozómov po

čas meiózy I a sesterských chromátid počas meiózy II, za vzniku haploidných oocytov. Poškodenie DV narušuje segregáciu chromozómov a prispieva k aneuploidii v ktoromkoľvek štádiu meiózy. Zároveň chyby v morfológii DV alebo zarovnaní chromozómov môžu mať za následok zastavenie bunkového cyklu, aneuploidiu a genetickú nestabilitu. Aneuploidia sa podieľa na dedení veľkého alebo malého počtu niektorého z chromozómov. U väčšiny aneuploidných embryí, ktoré zdedia iba jednu kópiu autozómu, sa vyvinú závažné abnormality a odumierajú pred tehotenstvom. Zdedenie ďalšej kópie autozómu je tiež spojené s vážnymi vývojovými abnormalitami a potratmi. Trizómia 21. chromozómu, príčina Downovho syndrómu, je najčastejšia aneuploidia ovplyvňujúca živonarodené deti^(3,7).

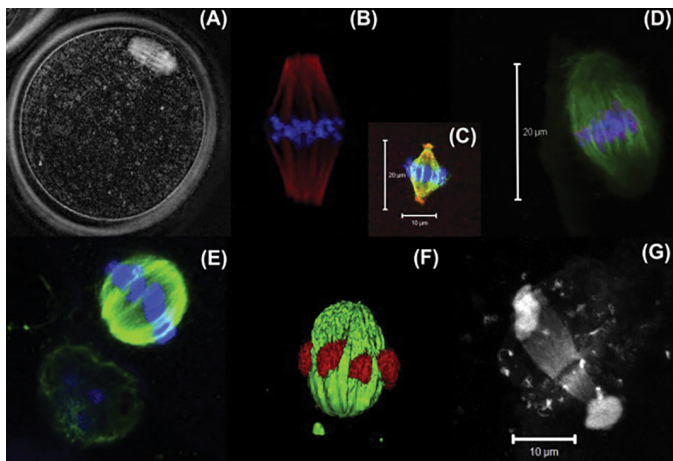
V oocytoch starších pacientov bola pozorovaná zvýšená incidencia straty chromozómov, fragmentácie či zhlukovania chromozómov a separácie ich chromátid. Dôvodom môže byť nárast abnormalných DV s narastajúcim vekom ženy. U žien vo veku nad 40 rokov, ktoré majú prirodzený cyklus, vykazujú takmer 80 % oocytov abnormalnú štruktúru DV alebo nesprávne zarovnanie chromozómov. Naopak, abnormalné DV vykazujú len 20 % oocytov u žien mladších ako 25 rokov. Tento zvýšený výskyt abnormalít u starších pacientok prispieva k zvýšenej miere aneuploidie s narastajúcim vekom^(7,8).

Vizualizácia deliaceho vretienka

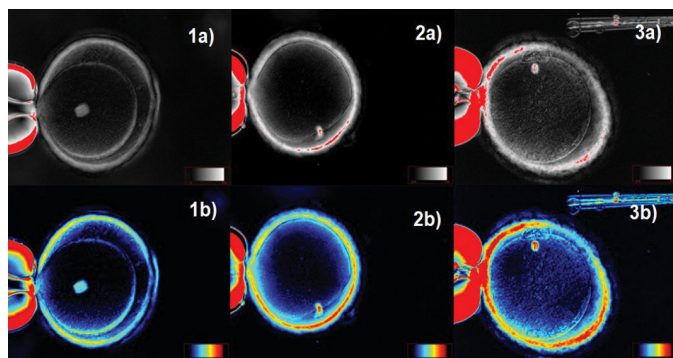
Štandardnou metódou na vizualizáciu DV bola tradične konfokálna mikroskopia, ktorá však vyžadovala fixáciu materiálu, a preto ju nebolo možné využiť na živé bunky. Ako alternatíva tejto metódy sa začala využívať vizualizácia DV pomocou polarizovaného svetla. Na detekciu abnormalít DV sa tak pri ľudských oocytoch zaviedla neinvazívna polarizačná svetelná mikroskopia. Táto metóda dokáže vizualizovať DV na základe prirodzenej fyzickej vlastnosti vysoko usporiadaných štruktúr v bunke (vrátane mikrotubulov) rozdvojiť svetelný lúč, čo sa nazýva retardácia alebo dvojlom svetla⁽⁹⁾.

Oosight je druh mikroskopu s polarizovaným svetlom, ktorý využíva na osvetlenie vzorky kruhovo polarizované svetlo. Takýto prístup dokáže merať retardáciu svetla v bunkových štruk-

Obrázok 3. Deliace vretienko: Rôzne spôsoby vizualizácie cicavčieho deliaceho vretienka. (A) DV vizualizované pomocou Oosight; (B, C) DV imunofluorescenčné farbenie pre tubulín; (D) ilustruje kinetochórové mikrotubuly ako zelené pruhy v MI oocyte; (E, F) 3D projektované DV v MII fáze; (G) zobrazenie DV v telofáze I počas vypudzovania pólového telieska⁽⁶⁾



Obrázok 4. Fázy prechodu z MI do MII pri dozrievaní oocytov: Zobrazenie oocytov pomocou systému Oosight (horný rad) a v polarizovanom svetle po spracovaní softvérom (spodný rad). Oocyty v štádiu metafázy I (1a, 1 b) nemajú vyformované pólové teliesko. V štádiu telofázy I môžeme v oocytoch pozorovať vypudené pólové teliesko (2a, 2 b). Deliace vretienko ešte nie je formované, ale tvorí len mikrotubulárny mostík medzi pólovým telieskom a oocytom. Pri plne zrele oocyte v MII fáze môžeme pozorovať vypudené pólové teliesko s plne formovaným deliacim vretienkom nachádzajúcim sa v jeho blízkosti (3a, 3 b).



túrach nezávisle od ich orientácie na polarizačné šošovky mikroskopu, čo štandardne limituje ich kvantifikáciu. Zároveň je tento prístup po digitálnom spracovaní obrazu dostatočne citlivý na meranie veľmi nízkych úrovní dvojlomu v živých bunkách, ako sú oocyty⁽¹⁰⁾.

Štúdie na ľudských oocytoch pomocou Oosight dokázali, že prítomnosť/absencia, tvar a veľkosť DV počas IVF koreluje s úspešnosťou liečby (**obrázok 4**). Ak dôjde k oplodneniu oocytu s absentujúcim alebo abnormálnym DV, má vzniknuté embryo výrazne horšiu predikciu pre ďalší vývin. Pri niektorých oocytoch takisto dochádza k posunu ich umiestnenia v rámci bunky mimo štandardnej pozície oproti pólovému teliesku. Dynamická povaha DV tak komplikuje postavenie vizualizácie DV ako biomarkera kvality oocytov a zároveň zavádza do analýzy kompetencie oocytu nový rozmer – kinetiku DV⁽¹¹⁾.

Po odbere oocytov (36 – 36,5 hodiny po podaní β -hCG) má iba 58 % oocytov v MII fáze vizualizovateľné DV. Najviac oocytov so zrelým DV sa objavuje 39-40 hodín po podaní β -hCG (92 – 96 % oocytov). Percento oocytov s normálnym DV výrazne klesá po 40,5-41 hodinách po podaní β -hCG (77 % oocytov), pretože dochádza k postupnému rozkladu DV. In vivo maturované oocyty u normorespondentov typicky vykazujú bipolárne MII vretienko 40 hodín po aplikácii β -hCG. U low-respond pacientov je však pre oocyty získané z preovulačných folikulov typické oneskorené dozrievanie^(12,13).

Metaanalýzy a systematické prehľady hodnotiace vplyv vizualizácie DV v ľudských oocytoch počas ICSI ukázali signifikantne pozitívny vplyv takejto vizualizácie na fertilizáciu oocytov, množstvo embryí so správnou morfológiou v štádiu zygoty, rýchlosť delenia embryí, percento kvalitných embryí na 3. deň a percento embryí dosahujúcich štádiu blastocysty^(10,11).

Záver a perspektívy

Vizualizácia deliaceho vretienka systémom Oosight predstavuje inovatívne riešenie v cykle IVF. Viacero publikácií ukázalo, že absencia DV alebo jeho patológie majú za následok horšiu fertilizáciu oocytov či zníženú kvalitu embryí, čo v konečnom dôsledku vedie k nižšej úspešnosti IVF cyklu. Vizualizácia DV preto slúži ako veľmi dobrá diagnosticko-terapeutická pomôcka v liečbe asistovanej reprodukcie. Použitie Oosightu sa odporúča pacientkam s nízkou ovariálnou rezervou, s vyšším vekom či u párov s úplným zlyhaním fertilizácie v predchádzajúcom cykle. Ďalšou skupinou sú pacientky s nízkym počtom získaných oocytov, veľkým počtom nezrelých oocytov či pacientky s embryami nízkej kvality. Vo všetkých prípadoch môže využitie takejto systému pomôcť odhaliť príčinu neplodnosti, prípadne tieto problémy priamo vyriešiť.

Vyhlásenie o bezkonfliktnosti: Nemám potenciálny konflikt záujmov.

Adresa pre korešpondenciu:

Mgr. Pavel Svitok
GYN-FIV, a. s., Centrum pre gynekológiu, urológiu
a asistovanú reprodukciu, Bratislava
Trnavská cesta 106, 821 01 Bratislava
e-mail: pavel.svitok@gyn-fiv.sk

Mgr. Patrik Šranko, MVDr. Gabriela Kaňová, PhD.,
MUDr. Peter Harbulák, PhD.
GYN-FIV, a. s., Centrum pre gynekológiu, urológiu
a asistovanú reprodukciu, Bratislava

Literatúra

- Hartshorne GM, Lyraou S, Hamoda H, et al. Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 805-819.
- <https://lnk.sk/jtp0>
- Hoshino Y, 2018. Updating the markers for oocyte quality evaluation: intracellular temperature as a new index. *Reprod Med Biol* 2018; 17: 434-441.
- Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online* 2006; 12(4): 507-512.
- <https://atlas.eshre.eu/>
- <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/meiotic-spindle>
- Keefe D, Kumar M, Kalbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertil Steril* 2015; 103(2): 317-322.
- Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into fe-

- male meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013; 28: 509-518.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod* 2001; 16(7): 1464-1468.
- García-Oro S, Rey MI, Rodríguez M, et al. Predictive value of spindle retardance in embryo implantation rate. *J Assist Reprod Genet* 2017; 34: 617-625.
- Asa E, Tabatabaee R, Farrokhi A, Nejatbaksh R. Relationship between meiotic spindles visualization and intracytoplasmic sperm injection outcomes in human oocytes. *Anat Cell Biol* 2017; 50(1): 26-32.
- Cooke S, Tyler JPP, Driscoll GL. Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod* 2003; 18: 2397-405.
- Montag M, Koster M, van der Ven K, et al. Gamete competence assessment by polarizing optics in assisted reproduction. *Hum Reprod* 2011; 17: 654-666.