

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie



**Kateřina Holubová**

Studium změn dělicího vřeténka a chromozomů vitrifikovaných a uměle maturovaných lidských oocytů.

Study of changes on spindle and chromosomes vitrified and *in vitro* matured human oocytes.

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/školitel: doc. Ing. Irena Kratochvílová, PhD., Fyzikální ústav AV ČR,

Na Slovance 2, 182 21, Praha 8

Praha, 2020

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala především mé školitelce doc. Ing. Ireně Kratochvílové, PhD. za skvělé vedení práce a za rady, které mi dala. Dále mému konzultantovi doc. RNDr. Ing. Vladimírovi Krylovu, Ph.D. za odborné rady. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině, která mi byla během celého studia i psaní práce oporou.

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

**Abstrakt:**

Cílem této práce je srovnání jednotlivých metodik kryoprotekce lidských oocytů z pohledu jejich přežití a úspěšnosti následného procesu mimotělního oplodnění. Tato práce shrnuje, jaký vliv má maturace oocyty, charakterizovaná stavem dělicího vřeténka, chromozomů a pólového tělíska na úspěšnost umělého oplodnění standardních (čerstvých) i vitrifikovaných oocytů. Získané poznatky povedou k lepšímu pochopení vztahů mezi stavem oocytů a konkrétními postupy *in vitro* fertilizace a kryoprotekce. Konečným, aplikačně zajímavým cílem bude návrh optimalizace metodik práce s oocyty tak, aby pravděpodobnost jejich úspěchu v IVF cyklu byla co největší.

**Klíčová slova:**

oocyt, vitrifikace, *in vitro* maturace (IVM), dělicí vřeténko, chromozomy, asistovaná reprodukce (AR)

**Abstract:**

The aim of this work is the comparison of cryoprotection methods for human oocytes regarding their survival rate and subsequent success in *in vitro* fertilization. This work showed the effect of oocyte maturation characterized by the state of the meiotic spindle, chromosomes and polar body on the success of *in vitro* fertilization of standard (fresh) and vitrified oocytes. The acquired knowledge will lead to a better understanding of the relationships between the state of oocytes and specific *in vitro* fertilization and cryoprotection procedures. The final, application-interesting goal will be to propose the optimization of methods for working with oocytes so that the probability of their success in the IVF cycle is as high as possible.

**Key words:**

oocytes, vitrification, *in vitro* maturation (IVM), meiotic spindle, chromosomes, assisted reproduction

## Seznam zkratek

IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
IVM	<i>in vitro</i> maturace
OPU	ovum pick up
GV	germinal vesicle
MI	metafáze I
MII	metafáze II
PCO	polycystic ovary syndrome
OHSS	ovarian hyperstimulation syndrome
CPA	cryoprotectant agent
MTOC	microtubule-organizing center
mRNA	messenger RNA
ICSI	intracytoplasmic sperm injection

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Stavba lidského oocytu .....	3
3	Oogeneze a folikulogeneze .....	3
4	Metody.....	4
4.1	<i>In vitro</i> fertilizace .....	4
4.2	Umělá maturace oocytů (IVM) .....	6
4.3	Kryoprotekce oocytů .....	7
4.3.1	Vitrifikace versus pomalé mražení .....	9
4.3.2	Vitrifikace oocytů v různých fázích zralosti .....	10
4.4	Mikroskopie .....	13
4.4.1	Polarizační mikroskop (polarization light microscopy) .....	13
5	Vliv vitrifikace na dělicí vřeténko a chromozomy .....	14
6	Vliv <i>in vitro</i> maturace na stav dělicího vřeténka a chromozomů .....	16
6.1	Změna úhlu dělicího vřeténka ku prvnímu pólovému tělísku .....	17
7	Závěr.....	19
8	Seznam použité literatury .....	20
9	Internetové zdroje .....	25

## 1 Úvod

Dlouhodobé uchovávání buněk a tkání za nízkých teplot je tradiční a standardně používaný postup. Skutečně dlouhodobé uchování (kryoprotekce) ovšem vyžaduje ochlazení biologického materiálu až k teplotám kapalného dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Při těchto nízkých teplotách nedochází k žádným známým biologickým reakcím. Zejména v poslední době hraje kryoprotekce buněk klíčovou roli v regenerativní medicíně a v procesu umělého oplodnění. Dlouhodobá kryoprotekce tkání, případně celých orgánů, je zatím především výzvou pro celý obor kryobiologie.

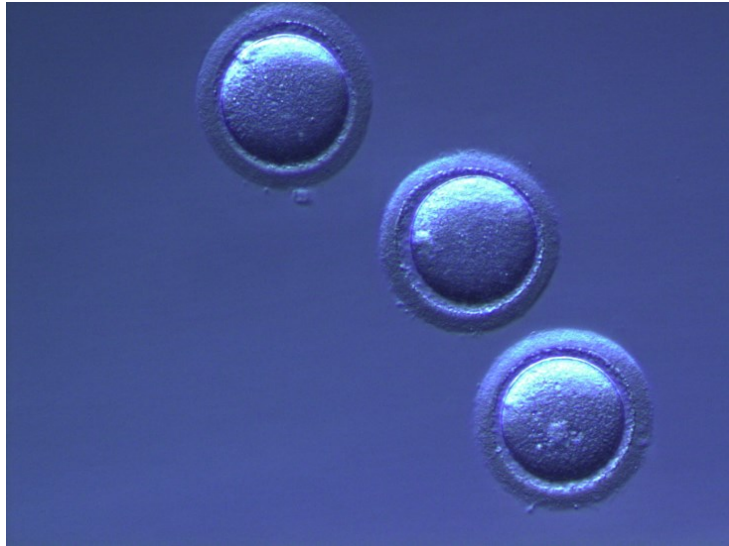
V asistované reprodukci hraje kryoprotekce buněk klíčovou roli, neboť umožňuje skutečně dlouhodobé uchovávání spermií, oocytů i embryí a tím jejich efektivnější využití. Vzhledem ke stoupající míře neplodnosti a narůstajícímu množství mladých onkologických pacientek, se neustále zvyšují požadavky na umělé oplodnění, zahrnující dlouhodobé uchovávání embryí i gamet, s maximálním udržením jejich přirozených funkcí a vlastností.

Kryoprotekce oocytů je výhodná zejména pro ženy, které nemají trvalého partnera. Reprodukční potenciál ženy se výrazně snižuje po dosažení 35. roku života, kdy výrazně klesá počet a kvalita maturovaných oocytů v IVF cyklu. Kryoprotekce oocytů v mladém věku může tedy zvýšit naději na pozdější početí (Mertes a Pennings 2011). Zároveň může kryoprotekce oocytů eliminovat specifické problémy spojené s náboženstvím a etikou, které nastávají při kryoprotekci embryí. Z embryí, získaných v jednom cyklu, je totiž typicky zavedena do dělohy pacientky jen část. Zbytek embryí je pak dále uchováván jen v případě specifického přání pacientky.

Vliv na úspěšnost oplodnění kryoprotektovaných oocytů má kromě specifické kryoprotekční metodiky stav, ve kterém je oocyt zmražen. V současnosti se hledají parametry, pomocí kterých lze určit vhodnou dobu pro zamražení oocytu. Relevantní se ukazuje zejména stupeň maturace oocytu, který je kvantifikovatelný pomocí pozorování pólového tělíska, dělicího vřeténka a dynamiky vzájemné pozice pólového tělíska a dělicího vřeténka (viz obr.1). Dělicí vřeténko je velmi významný objekt, který může být vitrifikací ohrožen a jehož defekty mohou způsobit nesprávnou segregaci chromozomů a následnou změnu ploidie chromozomů oocytu či jeho úplnou smrt. Na stav oocytů po rozmražení má významný vliv stupeň maturace, ve které se oocyty nacházejí těsně před mražením.

Úspěšnost kryoprotekce oocytů velice záleží na detailech zvoleného postupu. Cílem této práce je srovnání jednotlivých metodik kryoprotekce lidských oocytů v rámci procesu

mimotělního oplodnění a to z pohledu komplexní úspěšnosti (přežití, utilizace). Dále pak práce ukazuje, jaký vliv má maturace oocyty, charakterizovaná stavem dělicího vřeténka, a pólóvého tělíska na úspěšnost umělého oplodnění standardních (čerstvých) i rozmražených oocytů. Klíčové jsou především takové parametry, které v rámci klinické praxe umožní stanovit, kdy je daný oocyt vhodný pro fertilizaci, případně mražení.



**Obrázek 1:** Zralé lidské oocyty před oplodněním, fotografie z optického mikroskopu. Získáno v Centru asistované reprodukce, autor: O. Teplá, VFN, Praha, 2019.

## 2 Stavba lidského oocytu

Lidský oocyt je největší buňka těla, která vzniká redukčním meiotickým dělením - oogenezí. Obsahuje stejné struktury, které se vyskytují ve všech tělních buňkách. Kolem oocytu se utváří *zona pellucida*, která zodpovídá za polyspermatický blok. Pod cytoplazmatickou membránou (oolemou) se pak nachází kortikální granula, která po průniku spermie do oocytu mění vlastnosti *zona pellucida*. Kumulární buňky, sdružující se nad *zona pellucida*, slouží jako ochrana před poškozením, mají vyživovací a signalizační funkci a také regulační roli v rámci oplození.

V této práci bude pro lepší pochopení uveden krátký popis výše zmíněných struktur. *Zona pellucida* je nebuněčný glykoproteinový obal, který obklopuje cytoplazmatickou membránu a je složen z proteinů ZP1, ZP3, ZP2 a sacharidů. Nejdůležitější z těchto proteinů je ZP3, protože jeho cukerné zbytky jsou zodpovědné za rozpoznání vajíčka spermii. Obal si oocyt syntetizuje sám, během růstové fáze a zajišťuje si tím nejen obranu před polyspermií, ale i mechanickou ochranu. Tloušťka *zona pellucida* se liší u fertilizovaných ( $16,6 \pm 3,2 \mu\text{m}$ ) a nefertilizovaných oocytů ( $18,9 \pm 4,0 \mu\text{m}$ ). U žen, které v daném IVF cyklu otěhotněly, byla zjištěna u oocytů, zygot a následně transferovaných embryí významně užší *zona pellucida* než u žen, které neotěhotněly (K. Křížanovská et al. 2002).

Kortikální granula je organela specifická pro zralý oocyt nacházející se pod ooplazmou. Vezikuly obsahují proteázy, peroxidázy, mukopolysacharidy a hyalin. Po proniknutí spermie se spustí exocytóza granul (jinak kortikální reakce), čímž dojde k vyjití jejich obsahu do prostoru mezi oolemou a *zona pellucida*. To způsobí změnu struktury *zona pellucida* a další spermie se nemohou navázat.

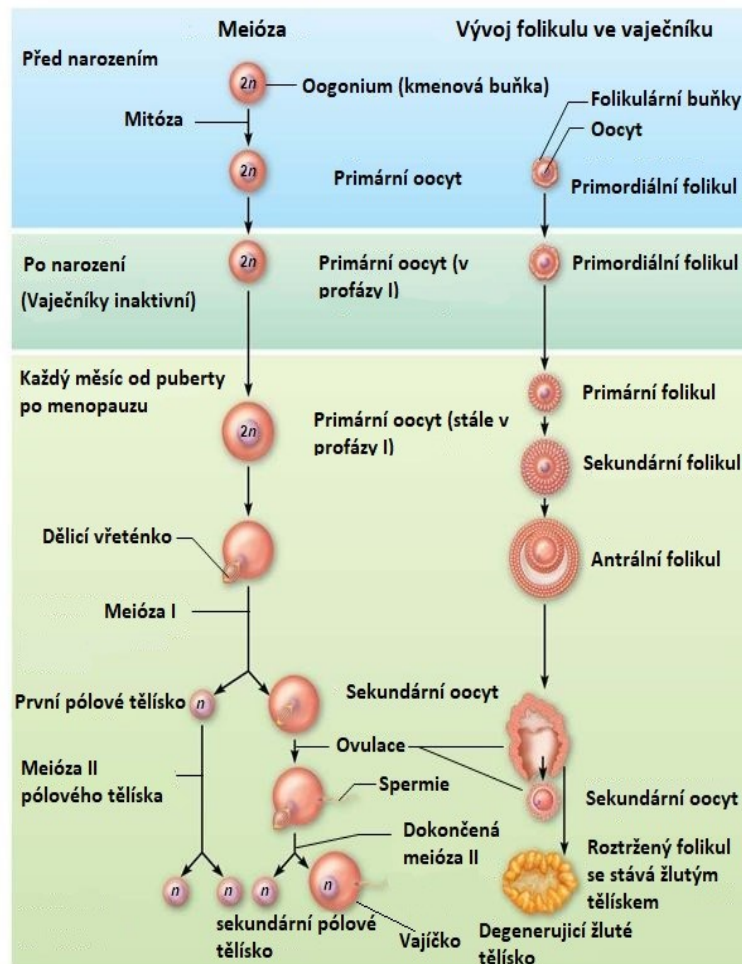
## 3 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je proces formování samičích gamet, zahrnující diferenciaci oocytu z oogonie a následné meiotické dělení. Tento komplexní proces je zahájen již v první polovině fetálního vývoje v ovariálních folikulech plodu. Před narozením je však proces zastaven a primární oocyty setrvávají ve fázi dictyotene, tedy v pozdní profázi prvního meiotického dělení, až do nástupu puberty. Oogenezi lze rozdělit do 2 etap a to: periody množení (mitóza) a redukčního dělení (meióza).

Folikulogenezi lze definovat jako postupný vývoj a růst ovariálního folikulu od stádia primordiálního po Graafův folikul. Zahrnuje fázově závislou expresi intraovariálních růstových

faktorů a jejich receptorů, které regulují proliferaci a diferenciaci granulózních a *theca* buněk (Gougeon 1986; Shimasaki et al. 2019).

Proces je zahájen již v raném embryonálním vývoji a úzce souvisí s oogenezí, protože vyvíjející se oocyty jsou součástí primordiálních folikulů, které jim zajišťují ochranu a výživu a zároveň během ovulace dochází k uvolnění zralého oocyta z Graafova folikulu.



© 2016 Pearson Education, Inc.

**Obrázek 2:** Popis oogeneze a folikulogeneze. Vývoj oocyta od oogonie až po sekundární oocyt a následné oplození spermíí. Primordiální folikul se vyvíjí v antrální, který po ovulaci praská a stává se žlutým tělískem. Upraveno dle URL1.

## 4 Metody

### 4.1 *In vitro* fertilizace

*In vitro* fertilizace (IVF) je metoda asistované reprodukce a zahrnuje soubor léčebných postupů, při kterých jsou zárodečné buňky ženy (oocyty) oplozeny spermii partnera nebo dárce mimo tělo ženy – jedná se o mimotělní oplodnění. Tato léčba patří mezi základní metody

umělého oplodnění. Proces IVF začíná hormonální stimulací ženy, která je nutná k získání většího počtu oocytů, než při pravidelném ovulačním cyklu. IVF se nejčastěji aplikuje u párů, které nemohou počít přirozenou cestou. Mezi příčiny ženské neplodnosti patří: anovulace, polycystické vaječníky, endometrióza a imunologický faktor. U mužů to jsou pre/posttestikulární a testikulární, imunologické a genetické příčiny. I přesto, že se jedná o velmi úspěšnou metodu, která má úspěšnost v jednom cyklu zhruba 20 % až 30 %, jsou zde faktory, které úspěšnost ovlivňují, a to zejména věk ženy (Kupka et al. 2014; Smith et al. 2015; Fauser 2019). Smith a kol. (2015) sledovali závislost mezi věkem ženy a úspěšností IVF a získali následující výsledky: u žen pod 40 let byla úspěšnost 32,3 % po jednom IVF cyklu, u žen ve věku 40 - 42 let úspěšnost klesla na 12,3 % na jeden cyklus a u žen nad 42 let byla úspěšnost pouze 4 %. Klemetii a kol. (2007) uvádí, že starší ženy (40 let a více) podstoupily 1,4krát více cyklů IVF, než ženy mladší (méně než 30 let).

Věk ženy má bezesporu významný vliv na kvalitu, resp. dynamiku maturace oocytů (Al-Obaidi, Mahdi, a Alwasiti 2018). Tyto buňky se totiž po narození ženy již dále nedělí a zůstávají uloženy ve vaječnicích, kde stárnou společně s ženským tělem. Dále jsou také oocyty vystavovány vnějším faktorům, které mají vliv na jejich kvalitu.

Na rozdíl od přirozeného cyklu, kdy se z Graafova folikulu zpravidla uvolňuje pouze jeden zralý oocyt, se při IVF hormonálně stimulují vaječníky za účelem co největšího zisku zralých oocytů, čímž se zvyšuje šance na úspěšné oplození. Délka stimulace závisí na zvoleném typu stimulačního protokolu, který se vybírá podle výsledku hormonálního vyšetření a věku ženy. Kliniky asistované reprodukce využívají nejčastěji 4 typy protokolů. Naivní – přirozený cyklus IVF, při kterém nedochází k hormonální stimulaci a je odebrán pouze jeden oocyt. Krátký protokol s minimální stimulací, který je šetrný, a ženě jsou podávány nízké hladiny gonadotropinů nebo antiestrogenů. Dlouhý stimulační protokol s antagonisty či agonisty zcela tlumí funkci hypofýzy a dozrání folikulů je řízeno uměle.

Další fází je odběr oocytů (OPU), který probíhá v krátké celkové narkóze po předešlém ultrazvukovém nebo hormonálním vyšetření. Jehla se zavádí pochvou pod ultrazvukovou kontrolou a z folikulů jsou odebrány oocyty společně s folikulární tekutinou. Následně se oocyty s kumulárními buňkami z folikulární tekutiny vybírají a transferují se do živné tekutiny. Nezbytně důležité je oocyty udržovat v teplotě 37 °C, jelikož pokles teploty by mohl znamenat jejich poškození.

V době odběru lze optickým mikroskopem odlišit oocyty pouze v základních maturačních stádiích: 1. GV oocyt (germinal vesicle) obsahuje velké jádro a bývá obklopen malým, kompaktním kumulem, 2. MI oocyt (metafáze I) po rozpadu jádra je chromatin organizovaný v chromozomech, nemá pólovou buňku, kumulus oocytu je expandující, 3. oocyty s viditelnou pólovou buňkou (tzv. prvním pólovým tělískem) mohou být v telofázi I, profázi II, nebo v konečné metafázi II. Pro úspěšnou fertilizaci je nejlépe použít oocyty v metafázi II, kdy jsou zralé, tzv. ovulační. Mají vřeténko s chromozomy, vydělené 1. pólové tělísko v perivitellinním prostoru a expandovaný rosolovitý kumulus. V tomto stadiu MII oocyty přirozeně setrvávají do doby oplození.

Po 3 až 6 hodinách se k odebraným oocytům přidávají spermie, tentýž den odebrané. Jejich počet se pohybuje okolo 100 000 na jeden oocyt. V *in vitro* podmínkách dochází k samovolnému oplození a po 14 až 16 hodinách se kontroluje kvalita embryí. Zygoty s více než dvěma prvójádry a neoplozené oocyty jsou odebrány a u zbylých embryí se čeká, než se vyvinou do stádia 4 buněk, tedy stádia způsobilého k embryotransferu. Většinou se kultivace prodlužuje až do stádia blastocysty, čímž se zabraňuje transferu embryí s patologiemi. Následně se nejúspěšnější 1 - 2 embrya transferují do dělohy pacientky a po 2 týdnech se dělá ultrazvukové vyšetření pro potvrzení těhotenství.

#### **4.2 Umělá maturace oocytů (IVM)**

Jedná se o metodu asistované reprodukce, u které nedochází, na rozdíl od IVF, k hormonální stimulaci vaječnicků. To znamená, že je pro organismus šetrnější a je vhodná zejména pro onkologické pacientky a ženy, které mají syndrom polycystických ovarií (PCO) a ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS). IMV lidských oocytů byla poprvé popsána v roce 1965 a úspěšné těhotenství a donošení následovalo roku 1989 (Cha et al. 1991).

Jedná se o zdlouhavý proces, během kterého se oocyty stávají kompetentní k fertilizaci a následné embryogenezi (Fasano, Demeestere, a Englert 2012). Nezralé GV oocyty jsou odebírány a přenášeny do kultivačního média, ve kterém maturují ideálně do stádia MII. Jelikož je zrání oocytů komplexní biologický proces a není snadné jej v laboratorních podmínkách napodobit, je úspěšnost IVM poměrně nízká.

*In vitro* maturace oocytů je vhodná pro ženy, které nemohou podstoupit hormonální stimulaci vaječnicků z důvodu jejich poškození nebo patologií či vlivem onkologické léčby. Zároveň zvyšuje šanci ženám, které hormonální stimulaci podstoupily, ale ne všechny odebrané oocyty byly ve stadiu MII. Ze studií vyplývá, že 15 - 20 procent oocytů odebraných

od hyperstimulovaných žen je nematurovaných (Smitz a Cortvrindt 2004; Mohsenzadeh et al. 2012).

### 4.3 Kryoprotekce oocytů

Pro kryoprotekci oocytů se historicky používaly techniky pomalého mražení a rychlého mražení (vitřifikace). V obou technikách mražení mají zásadní význam kryoprotektanty (CPA), které jsou součástí mrazicích roztoků. Jejich role spočívá ve snižování bodu tuhnutí roztoku a v redukování či prevenci tvorby ledových krystalů ve vodných roztocích. CPA musí splňovat určité podmínky, jako je vysoká rozpustnost ve vodě při nízkých teplotách, nízká toxicita, snižování bodu tuhnutí roztoku (Mazur 1980; Muldrew et al. 2004). Kryoprotektanty můžeme rozdělit podle jejich schopnosti procházet buněčnou membránou a vstupovat do cytoplazmy na prostupující a neprostupující, přičemž materiály, obecně nejpoužívanější pro kryoprotekci buněk, jsou: dimethylsulfoxid (DMSO), etylenglykol (EG), propylenglykol (PROH), sacharóza, trehalóza a glycin. V poslední době se značná pozornost věnuje kryoprotektantům ovlivňujícím kinetiku krystalizace ledu (např. nemrznoucí proteiny, malé nebo polymerní inhibitory rekrystalizace ledu). Charakteristickým rysem těchto materiálů je to, že způsobují tepelnou hysterezi - snižují bod tuhnutí systému, aniž by ovlivňovaly nebo dokonce zvyšovaly jeho teplotu tání (Kratochvílová et al. 2017).

Historicky se používala celá řada technik mražení oocytů a specifické modifikace protokolů se prováděly na empirickém základě. Po úspěších s pomalu mraženými embryi se začalo uvažovat nad kryoprotekcí oocytů (Trounson a Mohr 1983; Zeilmaker et al. 1984). První těhotenství a následný úspěšný porod z pomalu mražených MII oocytů proběhly roku 1986 (Chen 1986). Navzdory tomuto úspěchu, pomalu mražené oocyty vykazují nízký fertilizační potenciál (Lasala et al. 2006). To je způsobeno velkou senzitivitou vybraných struktur oocytů (dělicí vřeténko, membrána) k postupně se snižujícím teplotám. Zároveň během pomalého mražení nedojde ke vzniku skelné fáze jako při rychlém mražení, a naopak dojde k tvorbě ledových krystalů (Van der Elst 2003). Tento problém vyřešila poměrně nová metoda rychlého mražení (vitřifikace), kdy první narození z vitřifikovaných oocytů bylo oznámeno v roce 1999 (Kuleshova et al. 1999). Dlouhou dobu byla však tato metoda považována za experimentální, od roku 2013 je vitřifikace schválena pro využití v klinické praxi a je v současnosti v praxi převažující technikou.

Přidáním PCA do vnějšího prostředí oocytu se výrazně zvýší jeho osmolarita. Na rozdílné osmotické prostředí uvnitř a vně oocyty reagují difuzí vody do vnějšího prostředí a

opačně kryoprotektanty vstupují z vnějšího prostředí do oocytů. Celý proces se zastaví ve chvíli, kdy dojde k vyrovnání koncentrací PCA uvnitř a vně oocytů (Pegg 2007). Přítomnost kryoprotektantů snižuje objem ledové fáze ve zmraženém materiálu. Vzhledem k tomu, že oocyty mají kulový tvar, tak jejich poměr povrchu k objemu je pouze 0,05 (Gilmore et al. 1997). To znamená, že na rozdíl od spermií které jsou mraženy bez problémů, potřebují oocyty více času k vyrovnání osmotických tlaků (Fuller a Paynter 2004).

Technika pomalého mražení kombinuje řízenou rychlost mražení s nízkou koncentrací kryoprotektantů, což je spojeno s nižší toxicitou. Protože se předpokládá, že buněčný metabolismus klesá přibližně o 50 % za každých 10 °C snížení teploty, toxicita je omezena tím, že koncentrace kryoprotektantů a dalších rozpuštěných látek se zvyšují až poté, co byla buňka ochlazená na teploty, při kterých je metabolismus poměrně pomalý. Jak již bylo uvedeno výše, je zde však zvýšené riziko vzniku ledových krystalů, které mohou způsobit poškození či smrt buňky (Mazur 1963).

Vitrifikace kombinuje vysokou koncentraci PCA s extrémně vysokou rychlostí mražení. Díky vysoké koncentraci kryoprotektantů (typicky cukry) dojde k rychlému vyčerpání vody z oocytu v rámci vyrovnávání tlaků vně a uvnitř oocytu a pak jsou buňky ponořeny přímo do tekutého dusíku. Ochranou před tvorbou ledových krystalů je právě vysoká rychlost chlazení a vysoká koncentrace kryoprotektantů – obojí komplikuje standardní vznik a růst krystalů ledu, a naopak umožňuje realizaci skelného fázového přechodu z kapalné do pevné fáze, což minimalizuje poškození oocytů extracelulárním i intracelulárním ledem. Pokud se totiž voda ochlazuje pomalu, dojde k postupnému zpomalování pohybu jednotlivých částí jejích molekul. Při snižování teploty se vibrace molekul vody (fonony) postupně tlumí, až dojde k fixaci vzájemných poloh molekul vody do pravidelné krystalové struktury/ledu – voda má čas zkrystalizovat. Naopak, při velmi rychlém snižování teploty se s vysokou pravděpodobností zastaví pohyb molekuly vody v polohách, které neodpovídají krystalickému uspořádání – voda nemá čas zkrystalizovat a molekuly zatumnou v pozicích, blízkých těm, které zastávaly v kapalině. Procesu krystalizace obecně napomáhají nečistoty, resp. nukleační jádra. Naopak, teplotu krystalizace snižují a proces krystalizace vody komplikují standardně užívané kryoprotektanty (Kratochvílová et al. 2017).

V současnosti je čím dál větší snaha o zdokonalení vitrifikačních protokolů. Běžně se při vitrifikaci využívá jednoho či kombinace 2 kryoprotektantů ve vysokých koncentracích. Ke snížení toxicity a zabránění poškození oocytů může přispět snížení objemu vitrifikačního

média. Nikde však není uvedeno, jaké množství objemu roztoku je považováno za „minimum“. Arav A. a kol. (1993) vynalezli metodu minimální velikosti kapky, při které se využívá k vitrifikaci 0,1  $\mu\text{l}$  roztoku. Velkým benefitem této metody je snížení koncentrace kryoprotektantů až o 50 % oproti tradičním protokolům.

Vitrifikace využívá dvou způsobů uskladnění vzorků v tekutém dusíku: uzavřeného a otevřeného systému. Rozdíl spočívá v přímém kontaktu s tekutým dusíkem ( $\text{NL}_2$ ,  $-196\text{ }^\circ\text{C}$ ). Uzavřený systém je charakteristický tím, že vzorky jsou před kontaktem s tekutým dusíkem uzavřeny do obalu. V kontrastu k tomu, otevřený systém spočívá v přímém kontaktu oocytů a  $\text{NL}_2$ . V dnešní době se častěji používají otevřené systémy, jelikož uzavřené systémy jsou obecně spojeny s nižší rychlostí ochlazování/zahřívání, což může snižovat laboratorní a klinické výsledky (Vajta, Rienzi, a Ubaldi 2015). Oproti uzavřenému systému má však otevřený nevýhodu možné kontaminace patogeny obsaženými v tekutém dusíku. Tomu lze zabránit sterilizací nebo uskladněním vzorku v  $\text{NL}_2$  páře. Kuwayama M. (2007) se domnívá, že pravděpodobnost kontaminace z tekutého dusíku je nižší než bakteriální nebo virová infekce pomocí jednorázové chirurgické masky, která se běžně používá při odběru oocytů a manipulaci s embryi.

Vědci často opomíjenou vitrifikační fází je rozmražení oocytů. V poslední době se ukazuje, že rychlost oteplování je také významná pro přežívání oocytů podrobených vitrifikaci. Tato hypotéza byla potvrzena experimentálně na myších oocytech. Pokud byly myší oocyty mrazeny rychle a rozmrazeny pomalu, žádný z oocytů nepřežil. Pokud však byla rychlost rozmražení srovnatelná s rychlostí mražení či větší, oocyty úspěšně přežívaly (Seki a Mazur 2009; Mazur a Seki 2011). Z těchto výsledků tedy vyplývá, že optimální rychlost zahřívání závisí na optimální rychlosti chlazení.

#### **4.3.1 Vitrifikace versus pomalé mražení**

V případě vitrifikační metody je pokles teploty několikanásobně rychlejší než při pomalém mražení, konkrétně při vitrifikaci teplota klesá o  $15000\text{--}30000\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  při vysokých koncentracích kryoprotektiv. Poškození mikrotubulů dělicího vřeténka, které jsou senzitivní na pomalé změny teplot, je nižší při vitrifikaci. Tuto hypotézu potvrzuje studie M. Martínéz a kol. (2008), ve které uvádí, že oocyty mražené vitrifikací dosahovaly po rozmražení lepších výsledků při obnově dělicího vřeténka, než oocyty mražené pomalu. Navíc bylo dokázáno, že dělicí vřeténko se rychleji obnovuje u oocytů mražených metodou vitrifikace, než při pomalém snižování teploty (Ciotti et al. 2009). Správně provedená vitrifikace totiž vede k eliminaci

vzniku krystalické fáze v mraženém vzorku. Krystalky ledu v pomalu mraženém oocytu mohou významněji a specificky poškodit zejména dělicí aparát tak, že se po rozmražení obtížněji obnovuje.

Během let 2009 - 2014 bylo zjištěno, že vitrifikace oocytů má prokazatelně lepší vliv na jejich přežívání, implantaci a oplodnění v porovnání s pomalým mražením (Levi-Setti, Patrizio, a Scaravelli 2016). Chian a kol. (2009) uvádí míru přežití vitrifikovaných oocytů 93,9 %, míru oplodnění 74,6 %, míru implantace embryí 20,4 % a míru klinického těhotenství na transfer 46,7 %. V případě pomalého mražení byla pozorována míra přežití oocytů 63 %, oplodnění 59 %, implantace embryí 25 %, a míra klinického těhotenství na transfer 50 % (Fahy et al. 1984; Macfarlane a Forsyth 1990).

#### **4.3.2 Vitrifikace oocytů v různých fázích zralosti**

Pro centra asistované reprodukce má využití kombinace vitrifikace a IVM oocytů obrovský potenciál. O tom svědčí první narozené dítě z vitrifikovaných a IVM oocytů v roce 2009 (Chian et al. 2009). Avšak vitrifikace a IVM oocytů odebraných z nestimulovaných vaječníků má stále nízký potenciál. Proto je důležité vědět, v jaké fázi oocyty vitrifikovat. Zda je lepší mrazit maturované MII oocyty, nebo nematurované GV oocyty.

V době odběru lze optickým mikroskopem odlišit oocyty pouze ve třech základních maturačních stádiích: 1. GV oocyt (germinal vesicle), který obsahuje velké jádro a bývá obklopen malým, kompaktním kumulem, 2. M1 oocyt (metafáze I), u kterého je po rozpadu jádra chromatin organizovaný v chromozomech, nemá pólovou buňku, kumulus oocyty je expandující, 3. oocyty s viditelnou pólovou buňkou (tzv. prvním pólovým tělískem) mohou být v telofázi I, profázi II, nebo v konečné metafázi II. Pro úspěšnou fertilizaci je nejlépe použít oocyty v metafázi II, kdy jsou zralé, tzv. ovulační. Mají vřetenko s chromozomy, vydělené 1. pólové tělísko v periviteliním prostoru a expandovaný rosolovitý kumulus. V tomto stádiu MII oocyty přirozeně setrvávají do doby oplození. Samotná přítomnost pólového tělíska nemusí být tedy pro identifikaci finálního stádia zralosti oocyty dostatečná, a to vzhledem k výše uvedené skutečnosti, že některé oocyty s viditelným pólovým tělískem mohou být ve stádiích telofáze I, příp. profáze II (interfáze mezi prvním a druhým meiotickým dělením).

Konečná metafáze II oocyty je charakterizována definovaným srovnáním chromozomů do ekvatoriální roviny dělicího vřetenka. Dělicí vřetenko, jako mikrotubulární struktura podílející se na segregaci chromozomů, je tedy rozhodující pro správné dokončení meiózy a následnou úspěšnou fertilizaci. Pokud se v rámci procesu IVF podaří zobrazit kromě pólového

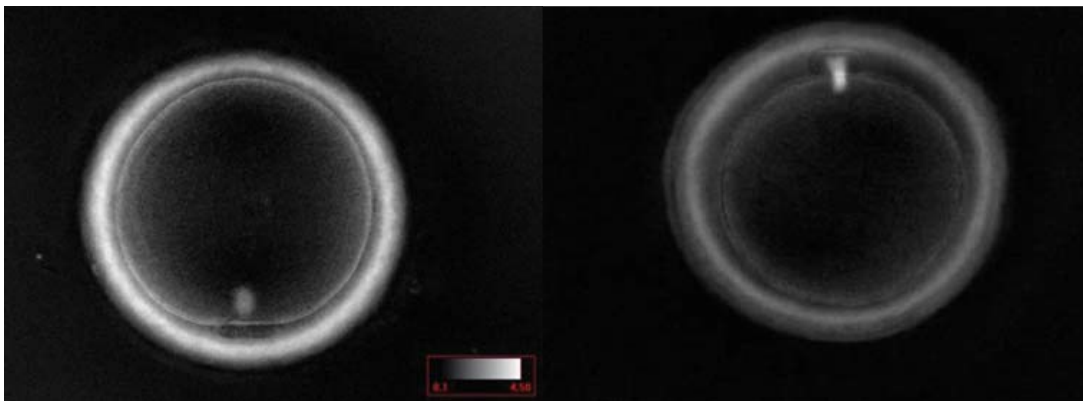
tělíška i dělicí vřeténko, získáme velmi komplexní informaci o stavu zralosti oocytů. Vizualizace opticky dvojlomného dělicího vřeténka se prakticky provádí pomocí neinvazivní polarizační mikroskopie (Oldenbourg a Mei 1995; Liu et al. 2000).

Na první pohled se může zdát, že stádium, ve kterém se oocyty nacházejí před vitrifikací není určující parametr pro asistovanou reprodukci, protože MII a GV oocyty přežívají vitrifikaci stejně úspěšně (80 – 85 %) (Cao et al. 2009). Bohužel ale platí, že vitrifikované immaturované GV oocyty mají signifikantně snížený maturační potenciál. Z výsledků metaanalýzy vyplývá, že až 24 % vitrifikovaných GV oocytů mělo po zahřátí problém s vyloučením pólového tělíška (Mohsenzadeh et al. 2019). Zároveň GV oocyty vykazují po vitrifikaci zvýšenou míru spontánní aktivace (H. Wang, Racowsky, a Combelles 2012).

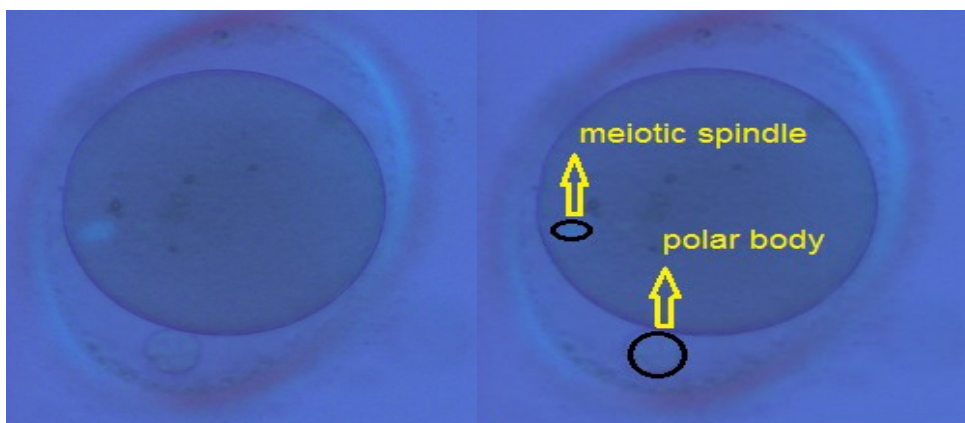
V IVF praxi jsou vybrané oocyty umístěny po dobu 2 až 6 hodin do inkubátoru, kde probíhá synchronizace zrání oocytů před inseminací. Zejména u starších (35+) pacientek je ovšem zvýšená pravděpodobnost výrazných změn dynamiky procesu dozrávání oocytů (Moore et al. 2007; Cimadomo et al. 2018). Kontrola stavu dělicího vřeténka polarizačním mikroskopem zpřesní stanovení skutečné maturace oocytů před jejich fertilizací. Pokud se vřeténko v oocytu ještě neobjevilo, případně nedosáhlo správné formy, je třeba počkat (i několik hodin), až oocyt dosáhne finální metafáze II. Nedetekovatelnost dělicího vřeténka však nemusí nutně znamenat, že není přítomno. L. Rienzi a kol. (2003) se domnívají, že chyba při detekci dělicího vřeténka může být způsobena vysokým stupněm posunutí dělicího vřeténka s ohledem na pozici prvního pólového tělíška. Pro lepší vizualizaci dělicího vřeténka využili metodu rotace pomocí ICSI mikropipety, čímž se jim povedlo detekovat dělicí vřeténko až u 91 % *in vitro* maturovaných oocytů. To je více, než kolik se povedlo detekovat Wang a kol. (2001).

Vzhledem k absenci dělicího vřeténka by se dalo předpokládat, že nematurované oocyty budou rezistentnější k termálním změnám, to se ale ukazuje být nepravdivé. Studie profesora Song W. a kol. (2016), která porovnává vliv vitrifikace na 3 skupiny oocytů (skupina A - *in vivo* maturované, skupina B - *in vitro* maturované a skupina C - nematurované) podává následující výsledky: výskyt dělicího vřeténka po rozmražení a jeho kvalita byla prokazatelně lepší u oocytů maturovaných *in vivo* nebo *in vitro* v porovnání s nematurovanými oocyty. V práci Larman a kol. (2006) bylo ukázáno, že oocyty, které byly vitrifikovány v profázi II, vykazují významně zvýšené množství abnormálních konfigurací dělicího aparátu a chromozomů v porovnání s oocyty vitrifikovanými ve stadiu metafáze II. Stav, resp. regenerace

po rozmražení jsou kritické pro další použití rozmražených oocytů. Nesprávně obnovený dělicí aparát (meiotické vřeténko) zapříčiní defektní konfiguraci chromozomů, což má za následek aneuploidie a polyploidie. Je jasné, že určení fáze zralosti oocytu je pro úspěch metodiky IVF zcela zásadní. První pólové tělíčko je viditelné standardním optickým mikroskopem, ale jeho přítomnost sama o sobě nestačí pro přesné odlišení profáze II a metafáze II (viz. Obr.3, 4) – je třeba zviditelnit dělicí vřeténko pomocí polarizační mikroskopie.



**Obrázek 3:** Ženský oocyt v metafázi II (vlevo) a telofázi I (vpravo) s viditelným pólovým tělískem i dělicím vřeténkem. V telofázi I oocyt dokončuje první meiotické dělení. Převzato z (Rienzi et al. 2012).



**Obrázek 4:** Ženský oocyt v metafázi II (vlevo) s viditelným pólovým tělískem i dělicím vřeténkem, které vůči sobě svírají úhel blízký 90°. Získáno v Centru asistované reprodukce, autor: O. Teplá VFN, Praha, 2019.

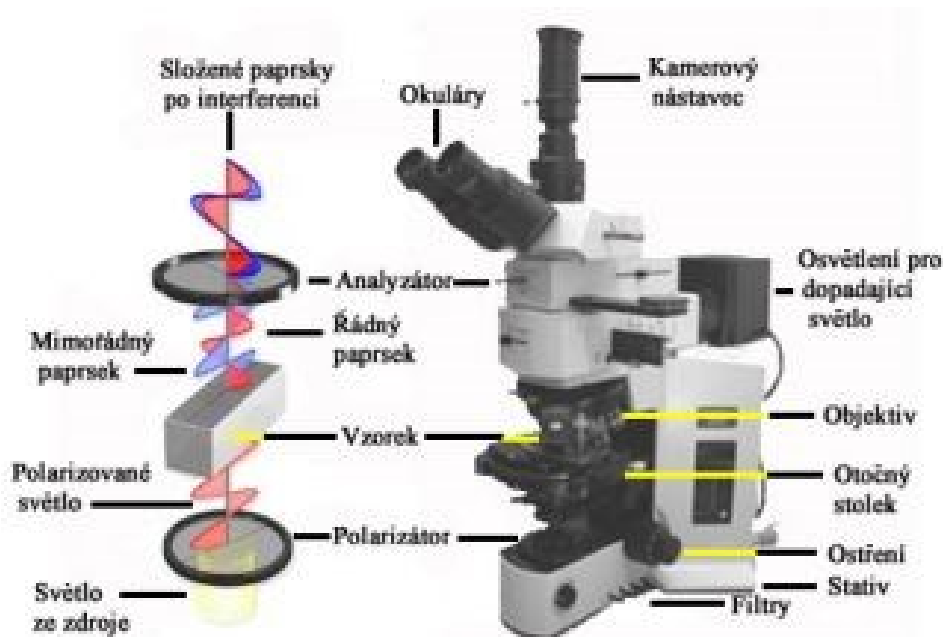
## 4.4 Mikroskopie

### 4.4.1 Polarizační mikroskop (polarization light microscopy)

V centrech asistované reprodukce se k pozorování oocytů standardně využívá optický mikroskop. Optickým mikroskopem lze zobrazit povrch oocytu (pólové tělísko, membránu, kumulární buňky), pokud ovšem chceme zobrazit dvojlomné dělicí vřeténko uvnitř oocytu, je třeba použít tzv. polarizační mikroskop (Obr.5). Polarizační mikroskopie je vhodná pro centra asistované reprodukce, jelikož není zapotřebí oocytů fixovat a zároveň nebyl doposud dokázán žádný negativní vliv na struktury oocytů (W. H. Wang, Meng, Hackett, a Keefe 2001). K zobrazení dělicího vřeténka s chromozomy a lze použít konfokální mikroskopii (Obr.6) (Coticchio et al. 2009). Takto mikroskopovaný oocyt již pak nelze dále fertilizovat, což činí tuto metodu nepoužitelnou pro centra asistované reprodukce.

Polarizační mikroskop využívá interakce světla s opticky anizotropními látkami, při které dochází k tzv. dvojlomu. V opticky anizotropním prostředí, jakým je i dělicí vřeténko v oocytu, totiž závisí rychlost světla na směru jeho šíření a na polarizaci. V důsledku toho se světelný paprsek v anizotropním prostředí rozdělí na dva paprsky – nastává dvojlom. Paprsek, procházející vzorkem se rozdělí na dva nové, jejichž vektory kmitají v rovinách vzájemně kolmých - vznikne řádný a mimořádný paprsek. Řádný a mimořádný paprsek jsou oproti sobě fázově posunuté. Dvojlom dělicího vřeténka je dán specifickým molekulárním uspořádáním (Bianchi et al. 2005).

Nepolarizované světlo je vlnění, jehož elektrický a magnetický vektory jsou orientovány zcela náhodně. Standardní světelný mikroskop takovéto světlo rovnou propouští na preparát. U polarizačního mikroskopu je světlo upraveno tak, že jeho vektory kmitají v jedné rovině – světlo je tzv. polarizované. Tento typ mikroskopu využívá propuštěné i odražené polarizované světlo ke kvalitativnímu a kvantitativnímu identifikování opticky anizotropních/dvojlomných struktur. Díky tomu, že dělicí vřeténko oocytů je dvojlomné, lze jej tedy pozorovat nedestruktivně polarizačním mikroskopem. Pokud bychom však pod polarizačním mikroskopem pozorovali látky jednolomné, viděli bychom pouze tmavé pole (URL2).



**Obrázek 5:** Polarizační mikroskop Olympus BX 51P. Převzato z URL2.

## 5 Vliv vitrifikace na dělicí vřeténko a chromozomy

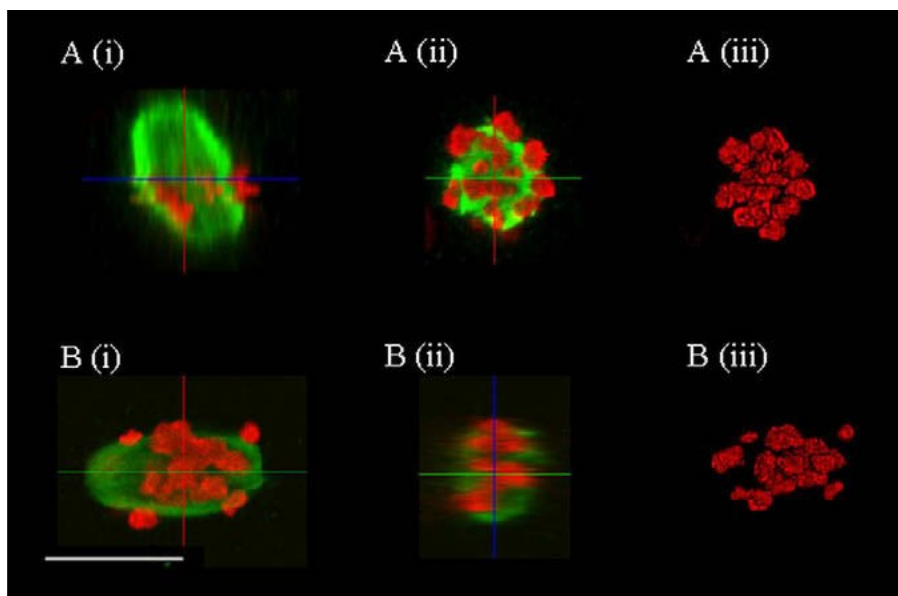
Dělicí vřeténko je buněčný aparát, který zajišťuje rovnoměrnou segregaci chromozomů do dceřiných buněk. Je tvořeno astrálními, kinetochorovými a polárními mikrotubuly, které přispívají ke správné funkci mitózy a meiózy. Mikrotubuly se skládají z proflament, která jsou tvořena dimery  $\alpha$  a  $\beta$  tubulinu. Mají plus a minus konce, na minus konci je  $\alpha$ -tubulin, kterým se ukotvují k centrozomu nebo k MTOC, a na plus konci je  $\beta$ -tubulin, který slouží k jejich prodlužování.

Je známo, že jak konfigurace dělicího vřeténka, tak chromozomální uspořádání během meiotické metafáze jsou velmi citlivé na změny teploty (Almeida a Bolton 1995; W.-H. Wang, Meng, Hackett, Odenbourg, et al. 2001). Následkem snižování teploty oocyty dochází k postupné depolymerizaci dělicího vřeténka (Konc et al. 2012). Tento rozpad je způsoben depolymerizací hlavního strukturního proteinu tubulinu (Petzelt 1979). Z výsledků Wang a kol. (2001) vyplývá, že k depolymerizaci dělicího vřeténka dochází již po pouhých deseti minutách při teplotě 33 °C (odchylka 4 stupně od tělesné teploty). Zároveň zjistili, že čím rychleji se oocyty ochlazují, tím rychleji dochází k depolymerizaci. Larman a kol (2007) a Ciotti a kol. (2009) ukázali, že dělicí aparát v MII fázi prochází následkem kryoprotekce depolymerací a dvojlomné vřeténko se rekonstruuje po vitrifikaci. Dynamika a stupeň obnovy dělicího

vřeténka rozmraženého oocyty závisí na věku pacientek a je úzce spojena s další funkcí oocytů v procesu fertilizace a vývoje embrya.

Chyby v segregaci chromozomů v oocytech jsou častější během prvního meiotického dělení. Možnými zásadními mechanismy jsou: chyba v rozložení chiasmat mezi homologními chromozomy v anafázi I, poruchy v rekombinaci a předčasná segregace sesterských chromatid. Chyby v metafázi II (MII) jsou výsledkem nesprávné segregace sesterských chromatid (Hassold a Hunt 2001). Změny v chromozomálním uspořádání, které by mohly být důsledkem poškození dělicího aparátu v průběhu kryoprotekce, by mohly vyvolat aneuploidie. Avšak z dosavadních studií vyplývá, že míra aneuploidií u embryí mladých žen je nízká a kryoprotekce nezvyšuje její úroveň (Munné et al. 2017; Buderatska et al. 2020). Tedy spíše než kryoprotekce má vliv na četnost aneuploidií věk ženy.

Kryoprotekce oocytů tedy způsobuje depolymeraci dělicího aparátu, po níž za vhodných okolností dojde k jeho obnově. V současnosti jsou ale pokroky ve vitrifikačních metodách tak značné, že přežití oocytů je nad 85 % a míry těhotenství u mladých pacientek srovnatelné s těmi, které nastaly po oplodnění nemraženými oocyty (Buderatska et al. 2020). Pokud je vitrifikace vhodně aplikována (oocyty jsou zmrazeny v definovaném maturačním stavu), je stav dělicího aparátu a chromozomů po rozmražení zcela obnoven. Ukázalo se ale, že určitá část vitrifikovaných oocytů vykazuje některé atypické rysy, tj. tendenci k prodloužení vřeténka a postavení chromozomů mimo vřeténko. Zvýšení vzdálenosti od pólu k pólu bylo doprovázeno zjevným zmenšením šířky celého dělicího aparátu (Obr.6), což může ovlivnit další procesy fertilizace a vývoje embrya (Coticchio et al. 2009). Gu a kol. (2020) však uvádí, že míra přežívání a vývojový potenciál MII oocytů s normálním dělicím vřeténkem nejsou ovlivněny vitrifikací. Pokud ale mají MII oocyty abnormální dělicí vřeténko, pak má vitrifikace negativní vliv na přežívání oocytů. Z těchto výsledků vyplývá, že morfologie dělicího vřeténka by měla být před vitrifikací kontrolována.



**Obrázek 6:** Fotografie z konfokální mikroskopie, (A) bipolární dělicí vřeténko s chromozomy, (chromozomy jsou umístěny uvnitř dělicího aparátu) B) prodloužený dělicí aparát s přemístěnými chromozomy, chromozomy jsou více na povrchu dělicího aparátu,. A (i) - A (ii), chromozomy zobrazeny v těsné konfiguraci spojené s mikrotubulovými svazky uvnitř vřeténka (pohledy shora a z boku), V B (i)- B (ii), většina chromozomů leží na povrchu vřeténka (pohledy shora a z boku). Trojrozměrná znázornění chromozomů jsou uvedena na panelech A (iii) a B (iii). Zelená =tubulin; červená = DNA, měřítko vlevo dole = 10  $\mu\text{m}$ . Převzato z (Coticchio et al. 2009).

## 6 Vliv *in vitro* maturace na stav dělicího vřeténka a chromozomů

*In vitro* maturace je složitý proces, který přežívá pouze omezené množství oocytů. Vzhledem k nízké úspěšnosti se IVM oocytů stala v posledních letech zájmem pozorování. Mezi časté pozorované změny oocytů patří: změna postavení kumulárních buněk, změna v morfologii mitochondrií, změna tloušťky *zona pellucida*, změny dělicího vřeténka a uspořádání chromozomů a pokles četnosti mRNA (Combelles, Albertini, a Racowsky 2003; Yang, Zhang, a Li 2009; Shahedi et al. 2013; M. Li et al. 2014; Lin et al. 2014). Tato práce se zejména zaměřuje na vliv IVM na dělicí vřeténko a chromozomy oocytů, protože konfigurace vřeténka je rozhodující pro věrnou segregaci chromozomů během meiotických dělení oocytu.

Dělicí vřeténko se nachází na periférii oocytu situované kolmo na *zona pellucida*. Za normální morfologii dělicího vřeténka se považuje sudovitý tvar s mírně zašpičatělými póly, mezi kterými vedou organizované mikrotubuly. Konfigurace chromozomů je považována za

normální, když jsou chromozomy uspořádány na kompaktní metafázové desce v ekvatoriální rovině (Boiso et al. 2002). Jakákoliv odchylka od tohoto standardu se považuje za abnormalitu. Morfologie a umístění dělicího vřeténka jsou ovlivněny různými faktory jako je věk matky, teplota, *in vitro* manipulace a typ kultivačního média.

IVM oocyty vykazují zvýšený výskyt abnormalit dělicího vřeténka a chromozomů oproti oocytům maturovaným *in vivo*. Tyto abnormality zahrnují částečnou či úplnou dezorganizaci vřeténka, rozptýlení, aberace a nižší kondenzaci chromozomů, což může mít za následek snížený fertilizační a implantační potenciál (Eichenlaub-Ritter, Shen, a Tinneberg 2002; Y. Li et al. 2006). Dále bylo dokázáno, že vzniklé abnormality způsobují aneuploidie oocytů (Pellestor, Anahory, a Hamamah 2005). Lei T. a kol. (2014) pozorovali obarvené IVM oocyty pod elektronovým mikroskopem a zjistili, že 45.2 % oocytů vykazovalo defektní vřeténko a 35.5 % mělo abnormální chromozomy. V porovnání s *in vivo* maturovanými oocytů je to signifikantně vyšší poměr (Y. Li et al. 2006).

Zajímavých výsledků dosáhli Wang a Keefe (2002), kteří nechali oocyty dozrát v laboratorních podmínkách po dobu 22 - 24 hodin. Poté pomocí polarizační mikroskopie sledovali stupeň maturace. U všech oocytů bez dvojlomného vřeténka byly detekovány abnormality v organizaci mikrotubulů a chromozomech. To může vysvětlovat nízkou úspěšnost fertilizace těchto oocytů.

Délka trvání IVM koreluje s četností abnormalit. To potvrzuje studie Zhang a kol. (2010), kdy embrya z oocytů maturovaných 48 hodin vykazovaly vyšší výskyt chromozomálních abnormalit v porovnání s embryi získaných z oocytů maturovaných 24 hodin. Navíc oocyty maturované kratší dobu mají tím spíše vlohly k dokončení meiózy a úspěšné fertilizaci (Nogueira et al. 2000).

### **6.1 Změna úhlu dělicího vřeténka ku prvnímu pólovému tělísku**

Polarizační mikroskopii se podařilo vizualizovat dvojlomné dělicí vřeténko v živých oocytech. To s sebou přineslo i řadu nových zjištění, jako je třeba význam úhlu dělicího vřeténka a prvního pólového tělíska. Během správného vývoje by se dělicí vřeténko mělo formovat přímo pod prvním pólovým tělískem (Taylor et al. 2008).

Správné postavení vřeténka a pólového tělíska může být zásadní pro metodu ICSI (intracytoplasmic sperm injection), kdy se jehlou spermie aplikuje přímo do oocytu. Do oocytu se jehla zavádí nejčastěji, pokud je pólové tělísko v pozici na 12. nebo 6. hodině, přičemž

signifikantně vyšší úspěšnost embryotransferu bylo dosaženo při vpichu oproti pozici pólóvého tělíška na 6. hodině (Nagy et al. 1995).

Otázkou tedy je, zda má změna v úhlu mezi pólóvým tělíškem a dělícím vřeténkem vliv na fertilizaci. Experimentálními pozorováními bylo zjištěno, že úhel se liší v době ICSI a zároveň se liší i po provedení této metody. Z výsledků studie Rienzi a kol. (2003) vyplývá, že pokud je úhel větší než  $90^\circ$ , tak se snížila frekvence normální fertilizace a zvýšil se výskyt abnormálních zygot se třemi prvojádry. Takovéto anomálie jsou způsobeny selháním anafáze II. U ostatních skupin ( $0\pm 5^\circ$ ,  $6\pm 45^\circ$  a  $46\pm 90^\circ$ ) nebyly pozorovány abnormality po fertilizaci. Změnu v úhlu nejspíše zapříčinilo odstranění kumulárních buněk a *corona radiata* před provedením ICSI, kdy vlivem této manipulace došlo k vychýlení prvního pólóvého tělíška z jeho původní pozice.

## 7 Závěr

Tato práce se zabývá změnami dělicího vřeténka a chromozomů *in vitro* maturovaných, vitrifikovaných a rozmražených. Porovnává výsledky publikací jak zahraničních, tak českých autorů a snaží se co nejlépe popsat hlavní změny na výše zmíněných strukturách oocyty i jaký vliv tyto změny mají na úspěšné oplodnění.

Pro úspěšnou fertilizaci a vitrifikaci oocytů v rámci IVF je nejlépe použít oocyty v metafázi II, kdy jsou zralé, tzv. ovulační. Mají vřeténko s chromozomy, vydělené 1. pólóvé tělísko v perivitelinním prostoru a expandovaný rosolovitý kumulus. V tomto stadiu MII oocyty přirozeně setrvávají do doby oplození. Konečná metafáze II oocyty je charakterizována definovaným srovnáním chromozomů do ekvatoriální roviny dělicího vřeténka. Dělicí vřeténko jako mikrotubulární struktura, podílející se na segregaci chromozomů, je tedy rozhodující pro správné dokončení meiózy a následnou úspěšnou fertilizaci. Pokud se nám v rámci procesu IVF podaří zobrazit kromě pólóvého tělíska i dělicí vřeténko, získáme velmi komplexní informaci o stavu zralosti oocytů. Vizualizace opticky dvojlomného dělicího vřeténka se prakticky provádí pomocí neinvazivní polarizační mikroskopie.

Oocyty, které po vitrifikaci vykazovaly nejmenší množství abnormálních konfigurací dělicího aparátu a chromozomů, byly vitrifikovány v metafázi II. Stav, resp. regenerace po rozmražení jsou kritické pro jejich další použití.

Postavení dělicího vřeténka vůči prvnímu vyloučenému pólóvému tělísku po rozmražení, je ukazatelem maturace oocyty. Pokud se dělicí vřeténko nepodařilo detekovat nebo byl jeho úhel vůči pólóvému tělísku větší než 90°, byla pravděpodobnost úspěšné fertilizace snížena. Z literatury vyplývá, že oocyty by měly být ideálně vitrifikovány v metafázi II. Nejlepších výsledků po rozmražení dosahují *in vivo* maturované oocyty, které před mražením dozrály do metafáze II. Další zkoumání vlivu kryoprotekčních a maturačních metod na úspěšnost umělého oplodnění a navržení optimalizace celého procesu bude tématem dalšího výzkumu, jelikož dosavadní úroveň znalostí je nedostačující.

## 8 Seznam použité literatury

- Almeida, Paula A., a Virginia N. Bolton. 1995. „The Effect of Temperature Fluctuations on the Cytoskeletal Organisation and Chromosomal Constitution of the Human Oocyte". *Zygote* 3(4): 357–65.
- Al-Obaidi, Manal Taha, Huda Bahjat Mahdi, a Estabraq Alwasiti. 2018. „The Impact of Age and BMI on Oocyte Maturation and Embryo Development". *Biomedical Research* 29(9): 1920–24.
- Arav, A., B. Rubinsky, G. Fletcher, a E. Seren. 1993. „Cryogenic Protection of Oocytes with Antifreeze Proteins". *Molecular Reproduction and Development* 36(4): 488–93.
- Bianchi, V. et al. 2005. „Meiotic Spindle Imaging in Human Oocytes Frozen with a Slow Freezing Procedure Involving High Sucrose Concentration". *Human Reproduction* 20(4): 1078–83.
- Boiso, Irene et al. 2002. „A Confocal Microscopy Analysis of the Spindle and Chromosome Configurations of Human Oocytes Cryopreserved at the Germinal Vesicle and Metaphase II Stage". *Human Reproduction* 17(7): 1885–91.
- Buderatska, Nataliia et al. 2020. „Does Human Oocyte Cryopreservation Affect Equally on Embryo Chromosome Aneuploidy?" *Cryobiology* 93: 33–36.
- Cao, Yunxia et al. 2009. „Cryopreservation of Immature and In-Vitro Matured Human Oocytes by Vitrification". *Reproductive BioMedicine Online* 19(3): 369–73.
- Cimadomo, Danilo et al. 2018. „Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence". *Frontiers in Endocrinology* 9(327).
- Ciotti, Patrizia Maria et al. 2009. „Meiotic Spindle Recovery Is Faster in Vitrification of Human Oocytes Compared to Slow Freezing". *Fertility and Sterility* 91(6): 2399–2407.
- Combelles, Catherine M. H., David F. Albertini, a Catherine Racowsky. 2003. „Distinct Microtubule and Chromatin Characteristics of Human Oocytes after Failed In-Vivo and in-Vitro Meiotic Maturation". *Human Reproduction (Oxford, England)* 18(10): 2124–30.
- Coticchio, G et al. 2009. „Vitrification May Increase the Rate of Chromosome Misalignment in the Metaphase II Spindle of Human Mature Oocytes". *Reproductive BioMedicine Online* 19: 29–34.
- Eichenlaub-Ritter, Ursula, Ying Shen, a Hans-Rudolf Tinneberg. 2002. „Manipulation of the Oocyte: Possible Damage to the Spindle Apparatus". *Reproductive Biomedicine Online* 5(2): 117–24.
- Fahy, G. M., D. R. MacFarlane, C. A. Angell, a H. T. Meryman. 1984. „Vitrification as an Approach to Cryopreservation". *Cryobiology* 21(4): 407–26.

- Fasano, Giovanna, Isabelle Demeestere, a Yvon Englert. 2012. „In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification?" *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29(6): 507–12.
- Fausser, Bart CJM. 2019. „Towards the Global Coverage of a Unified Registry of IVF Outcomes". *Reproductive BioMedicine Online* 38(2): 133–37.
- Fuller, Barry, a Sharon Paynter. 2004. „Fundamentals of Cryobiology in Reproductive Medicine". *Reproductive BioMedicine Online* 9(6): 680–91.
- Gilmore, J. A., J. Liu, D. Y. Gao, a J. K. Critser. 1997. „Determination of Optimal Cryoprotectants and Procedures for Their Addition and Removal from Human Spermatozoa". *Human Reproduction* 12(1): 112–18.
- Gougeon, Alain. 1986. „Dynamics of Follicular Growth in the Human: A Model from Preliminary Results". *Human Reproduction* 1 (2) : 81 -87.
- Gu, Rui-Huan et al. 2020. „Vitrification of In vitro-matured Oocytes: Effects of meiotic spindle morphology on clinical outcome". *Reproductive and Developmental Medicine* 4: 18.
- Hassold, Terry, a Patricia Hunt. 2001. „To Err (Meiotically) Is Human: The Genesis of Human Aneuploidy". *Nature Reviews Genetics* 2(4): 280–91.
- Cha, K. Y. et al. 1991. „Pregnancy after in Vitro Fertilization of Human Follicular Oocytes Collected from Nonstimulated Cycles, Their Culture in Vitro and Their Transfer in a Donor Oocyte Program". *Fertility and Sterility* 55(1): 109–13.
- Chen, C. 1986. „Pregnancy after Human Oocyte Cryopreservation". *Lancet (London, England)* 1(8486): 884–86.
- Chian, Ri-Cheng et al. 2009. „Live Birth after Vitrification of in Vitro Matured Human Oocytes". *Fertility and Sterility* 91(2): 372–76.
- K. Křižanovská et al. 2002. „Analýza zona pellucida lidských oocytů a embryí v programu asistované reprodukce". *Česká gynekologie* (4) : 197-202.
- Klemetti, Reija, Mika Gissler, Tiina Sevón, a Elina Hemminki. 2007. „Resource allocation of in vitro fertilization: a nationwide register-based cohort study". *BMC Health Services Research* 7: 210.
- Konc, János et al. 2012. „Freezing of Oocytes and Its Effect on the Displacement of the Meiotic Spindle: Short Communication". *The Scientific World Journal* 2012: e785421.
- Kratochvílová, Irena et al. 2017. „Theoretical and Experimental Study of the Antifreeze Protein AFP752, Trehalose and Dimethyl Sulfoxide Cryoprotection Mechanism: Correlation with Cryopreserved Cell Viability". *RSC Advances* 7(1): 352–60.
- Kuleshova, Lilia et al. 1999. „Birth Following Vitrification of a Small Number of Human Oocytes: Case Report". *Human Reproduction* 14(12): 3077–79.

- Kupka, M. S. et al. 2014. „Assisted Reproductive Technology in Europe, 2010: Results Generated from European Registers by ESHRE". *Human Reproduction (Oxford, England)* 29(10): 2099–2113.
- Kuwayama, Masashige. 2007. „Highly Efficient Vitrification for Cryopreservation of Human Oocytes and Embryos: The Cryotop Method". *Theriogenology* 67(1): 73–80.
- Larman, Mark G, Courtney B Sheehan, a David K Gardner. 2006. „Vitrification of Mouse Pronuclear Oocytes with No Direct Liquid Nitrogen Contact". *Reproductive BioMedicine Online* 12(1): 66–69.
- Larman, Mg, Mg Minasi, L Rienzi, a Dk Gardner. 2007. „Maintenance of the Meiotic Spindle during Vitrification in Human and Mouse Oocytes". *Reproductive BioMedicine Online* 15(6): 692–700.
- Lasala, G et al. 2006. „Outcome of 518 Salvage Oocyte-Cryopreservation Cycles Performed as a Routine Procedure in an in Vitro Fertilization Program". *Fertility and Sterility* 86(5): 1423–27.
- Levi-Setti, Paolo Emanuele, Pasquale Patrizio, a Giulia Scaravelli. 2016. „Evolution of Human Oocyte Cryopreservation: Slow Freezing versus Vitrification". *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 23(6): 445–50.
- Li, Min et al. 2014. „Chromosomal Aberrations in In-Vitro Matured Oocytes Influence Implantation and Ongoing Pregnancy Rates in a Mouse Model Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection". *PLOS ONE* 9(7): e103347.
- Li, Yuan et al. 2006. „Confocal Microscopic Analysis of the Spindle and Chromosome Configurations of Human Oocytes Matured in Vitro". *Fertility and Sterility* 85(4): 827–32.
- Lin, Yu-Hung et al. 2014. „Reduced Uterine Receptivity for Mouse Embryos Developed from In-Vitro Matured Oocytes". *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31(12): 1713–18.
- Liu, Lin, James R. Trimarchi, Rudolf Oldenbourg, a David L. Keefe. 2000. „Increased Birefringence in the Meiotic Spindle Provides a New Marker for the Onset of Activation in Living Oocytes". *Biology of Reproduction* 63(1): 251–58.
- Macfarlane, Douglas R., a Maria Forsyth. 1990. „Recent Insights on the Role of Cryoprotective Agents in Vitrification". *Cryobiology* 27(4): 345–58.
- Martinez, M. et al. 2008. „Vitrification vs. Slow Freezing of Oocytes: Effects on Morphological Appearance, Meiotic Spindle Configuration and DNA Damage". *Fertility and Sterility* 90: S25.
- Mazur, Peter. 1963. „Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing". *The Journal of General Physiology* 47(2): 347–69.

- . 1980. „Limits to Life at Low Temperatures and at Reduced Water Contents and Water Activities". In *Limits of Life*, Limits of Life, ed. Cyril Ponnampereuma a Lynn Margulis. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–23.
- Mazur, Peter, a Shinsuke Seki. 2011. „Survival of Mouse Oocytes after Being Cooled in a Vitrification Solution to  $-196^{\circ}\text{C}$  at  $95^{\circ}$  to  $70,000^{\circ}\text{C}/\text{Min}$  and Warmed at  $610^{\circ}$  to  $118,000^{\circ}\text{C}/\text{Min}$ : A New Paradigm for Cryopreservation by Vitrification". *Cryobiology* 62(1): 1–7.
- Mertes, Heidi, a Guido Pennings. 2011. „Social Egg Freezing: For Better, Not for Worse". *Reproductive BioMedicine Online* 23(7): 824–29.
- Mohsenzadeh, Mehdi et al. 2012. „Effect of Vitrification on Morphology and In-Vitro Maturation Outcome of Human Immature Oocytes". *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia* 117(3): 190–98.
- . 2019. „Vitrification has detrimental effects on maturation, viability, and subcellular quality of oocytes post IVM in cancerous women: An experimental study". *International Journal of Reproductive Biomedicine* 17(3): 175–84.
- Moore, A.K., M. Arny, K. Lynch, a D.R. Grow. 2007. „Oocyte Maturation Arrest More Common in Younger Patients Undergoing IVF/ICSI". *Fertility and Sterility* 88: S271.
- Muldrew, K., Jason Acker, J.A.W. Elliot, a Locksley Mcgann. 2004. „The water to ice transition: Implications for living cells". In *Life in the Frozen State*, , 67–108.
- Munné, S. et al. 2017. „Euploidy Rates in Donor Egg Cycles Significantly Differ between Fertility Centers". *Human Reproduction* 32(4): 743–49.
- Nagy, Z. P. et al. 1995. „The Influence of the Site of Sperm Deposition and Mode of Oolemma Breakage at Intracytoplasmic Sperm Injection on Fertilization and Embryo Development Rates". *Human Reproduction (Oxford, England)* 10(12): 3171–77.
- Nogueira, D., C. Staessen, H. Van de Velde, a A. Van Steirteghem. 2000. „Nuclear Status and Cytogenetics of Embryos Derived from in Vitro-Matured Oocytes". *Fertility and Sterility* 74(2): 295–98.
- Oldenbourg, R., a G. Mei. 1995. „New Polarized Light Microscope with Precision Universal Compensator". *Journal of Microscopy* 180(2): 140–47.
- Pegg, David E. 2007. „Principles of Cryopreservation". In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Methods in Molecular Biology, ed. John G. Day a Glyn N. Stacey. Totowa, NJ: Humana Press, 39–57.
- Pellestor, F., T. Anahory, a S. Hamamah. 2005. „The Chromosomal Analysis of Human Oocytes. An Overview of Established Procedures". *Human Reproduction Update* 11(1): 15–32.
- Petzelt, Christian. 1979. „Biochemistry of the Mitotic Spindle". In *International Review of Cytology*, Elsevier, 53–92.

- Rienzi, L. et al. 2003. „Relationship between Meiotic Spindle Location with Regard to the Polar Body Position and Oocyte Developmental Potential after ICSI". *Human Reproduction* 18(6): 1289–93.
- Rienzi, L., B. Balaban, T. Ebner, a J. Mandelbaum. 2012. „The Oocyte". *Human Reproduction* 27(suppl 1): i2–21.
- Seki, Shinsuke, a Peter Mazur. 2009. „The Dominance of Warming Rate over Cooling Rate in the Survival of Mouse Oocytes Subjected to a Vitrification Procedure". *Cryobiology* 59(1): 75–82.
- Shahedi, Abbas, Mohammad Ali Khalili, Mehrdad Soleimani, a Shekoufeh Morshedizad. 2013. „Ultrastructure of in Vitro Matured Human Oocytes". *Iranian Red Crescent Medical Journal* 15(12): e7379.
- Shimasaki, S, Rk Moore, Gf Erickson, a F Otsuka. 2019. „The Role of Bone Morphogenetic Proteins in Ovarian Function". *Bioscientifica Proceedings* 61: 323–37.
- Smith, Andrew D.A.C., Kate Tilling, Scott M Nelson, a Debbie A Lawlor. 2015. „Live-birth rate associated with repeat in vitro fertilisation treatment cycles". *JAMA* 314(24): 2654–62.
- Smitz, J. E. J., a R. G. Cortvrindt. 2004. „In Vitro Growth and Maturation of Oocytes in Human and Non-Human Primates". *Gynecologic and Obstetric Investigation* 57(1): 18–21.
- Song, Wen-yan et al. 2016. „Effects of Vitrification on Outcomes of In Vivo Mature, In Vitro-Mature and Immature Human Oocytes". *Cellular Physiology and Biochemistry* 38(5): 2053–62.
- T, Lei et al. 2014. „Vitrification of in Vitro Matured Oocytes: Effects on Meiotic Spindle Configuration and Mitochondrial Function." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(3): 1159–65.
- Taylor, Tyl Harrison et al. 2008. „Effect of Denuding on Polar Body Position in In-Vitro Matured Oocytes". *Reproductive BioMedicine Online* 17(4): 515–19.
- Trounson, Alan, a Linda Mohr. 1983. „Human Pregnancy Following Cryopreservation, Thawing and Transfer of an Eight-Cell Embryo". *Nature* 305(5936): 707–9.
- Vajta, Gábor, Laura Rienzi, a Filippo Maria Ubaldi. 2015. „Open versus Closed Systems for Vitrification of Human Oocytes and Embryos". *Reproductive BioMedicine Online* 30(4): 325–33.
- Van der Elst, J. 2003. „Oocyte Freezing: Here to Stay?" *Human Reproduction Update* 9(5): 463–70.
- Wang, Haiyan, Catherine Racowsky, a Catherine M. H. Combelles. 2012. „Is It Best to Cryopreserve Human Cumulus-Free Immature Oocytes before or after in Vitro Maturation?" *Cryobiology* 65(2): 79–87.

- Wang, W. H., L. Meng, R. J. Hackett, R. Odenbourg, et al. 2001. „The Spindle Observation and Its Relationship with Fertilization after Intracytoplasmic Sperm Injection in Living Human Oocytes". *Fertility and Sterility* 75(2): 348–53.
- Wang, W. H., L. Meng, R. J. Hackett, a D. L. Keefe. 2001. „Developmental Ability of Human Oocytes with or without Birefringent Spindles Imaged by Polscope before Insemination". *Human Reproduction* 16(7): 1464–68.
- Wang, Wei Hua, a David L. Keefe. 2002. „Prediction of Chromosome Misalignment among in Vitro Matured Human Oocytes by Spindle Imaging with the PolScope". *Fertility and Sterility* 78(5): 1077–81.
- Wang, Wei-Hua, Li Meng, Rickard J. Hackett, Rudolf Odenbourg, et al. 2001. „Limited Recovery of Meiotic Spindles in Living Human Oocytes after Cooling–Rewarming Observed Using Polarized Light Microscopy". *Human Reproduction* 16(11): 2374–78.
- Yang, Yong-jie, Yan-jun Zhang, a Yuan Li. 2009. „Ultrastructure of Human Oocytes of Different Maturity Stages and the Alteration during in Vitro Maturation". *Fertility and Sterility* 92(1): 396.e1-6.
- Zeilmaker, Gerard H. et al. 1984. „Two Pregnancies Following Transfer of Intact Frozen-Thawed Embryos". *Fertility and Sterility* 42(2): 293–96.
- Zhang, Xiao Yun et al. 2010. „Chromosome Abnormality Rates in Human Embryos Obtained from In-Vitro Maturation and IVF Treatment Cycles". *Reproductive Biomedicine Online* 21(4): 552–59.

## 9 Internetové zdroje

URL 1 - <https://slideplayer.com/slide/10165467/>

URL 2 - <http://bwoptics.com/newsend2.asp?id=7>