

Metody pozyskiwania oocytów ich klasyfikacja i selekcja do IVM



dr Ricardo Faundez

Klinika Zwierząt Gospodarskich
z Ambulatorium wyjazdowym

Katedra Nauk Klinicznych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

IVM oocytów ludzkich

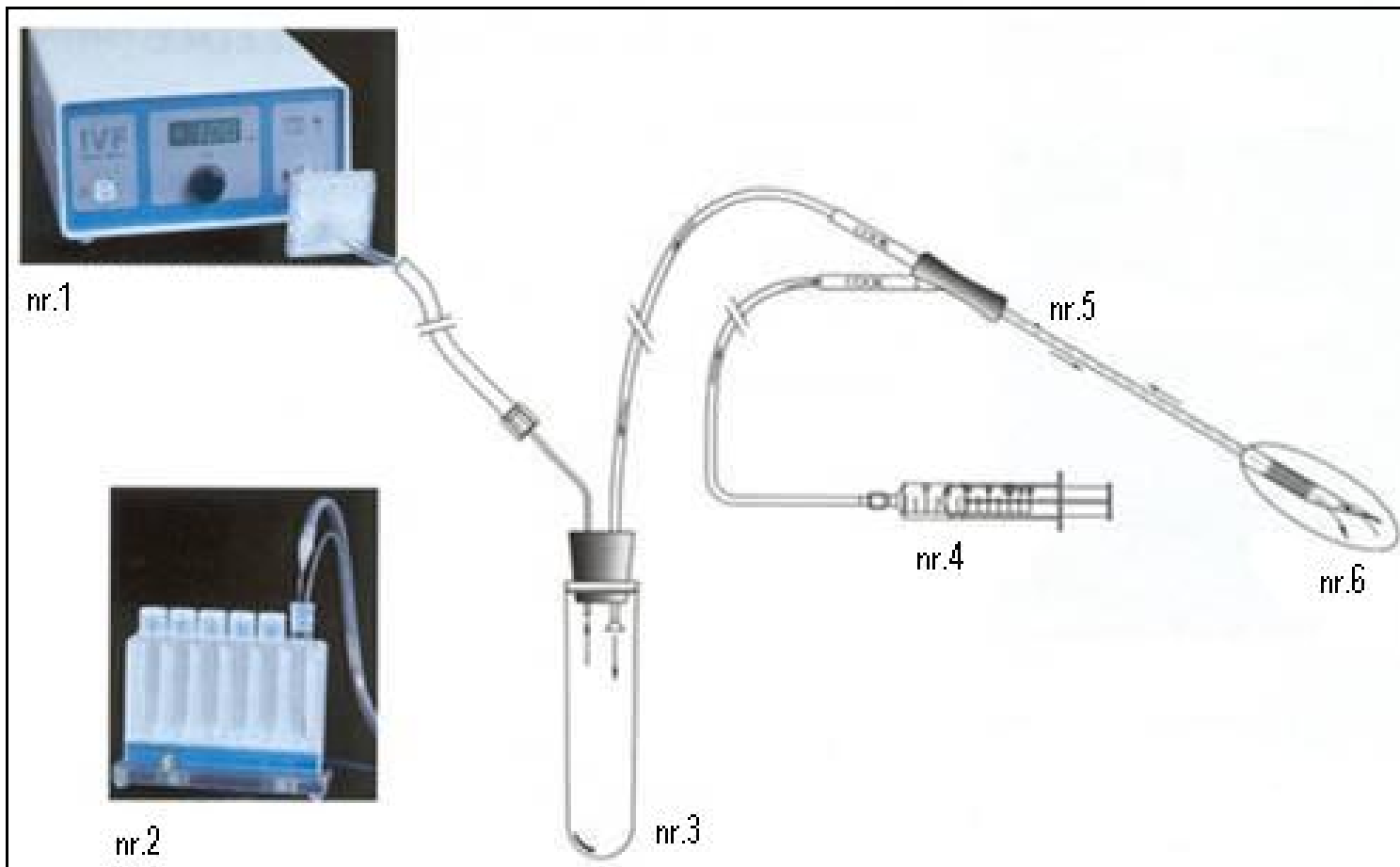




IVF JAPAN

Indication and Procedure

Indications for IVM	PCO, Normal menstrual cycle, poor quality embryo case
Monitoring	From Day 7
Timing of oocyte collection	Two follicles >7mm
Cancellation criteria	Dominant follicle, Cyst formation
HCG priming	10000iu HCG 36 hrs before OPU
Oocyte collection	Aspiration pressure 100mmHG IVF OSAKA IVM needle
IVM medium	IVM Medium (Medicult), 10% Patient's serum, HCG 100 IU/ l, FSH 75 IU/l
Maturation time	24 hours
Fresh or Frozen Embryo transfer	Endom.>8mm Fresh ET



Schemat sprzętu używanego do aspiracji pęcherzyków :

Nr.1 Pompa próżniowa wytwarzająca ciśnienie.

Nr.2 Blok grzewczy, w którym znajdują się probówki.

Nr.3 Probówka do której trafia pobierany płyn pęcherzykowy.

Nr.4 Strzykawka służąca do przepłukiwania igły aspiracyjnej.

Nr.5 Dwukanałowa igła służąca do punkcji pęcherzyków.

Nr.6 Igła punkcyjna.

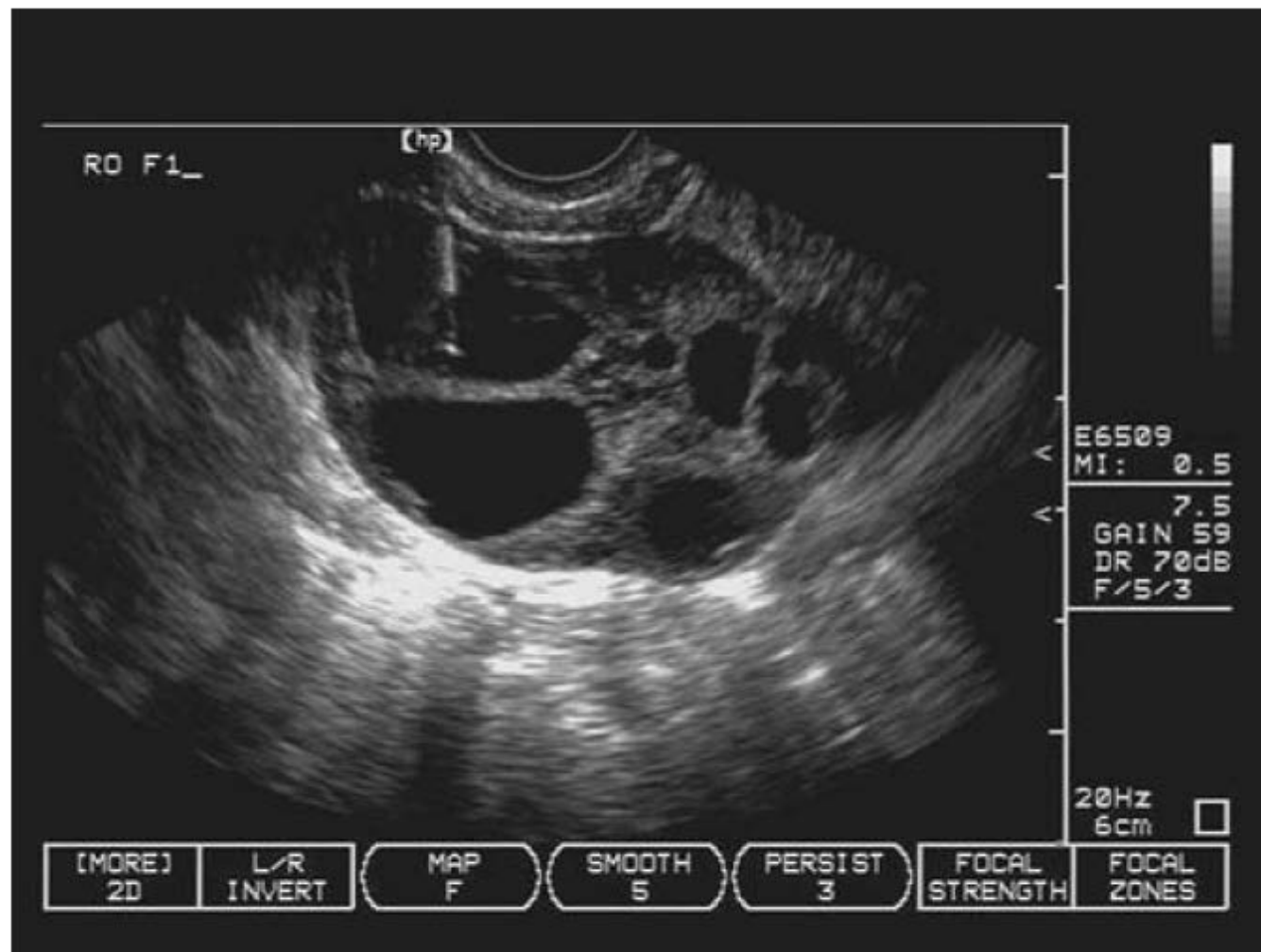


Figure 3 Ultrasound image taken during oocyte retrieval. The highly echogenic band around the distal end of the needle and the tip of the follicle aspiration needle are visualized in the superior-most follicle. The needle is maneuvered within the ovary to aspirate all follicles. *Source:* Image courtesy of Dr. Roger Stronell.





Figure 4 Midsagittal view of the uterus. The cervix is to the right of the image and the fundus is to the left. The endometrium is well demarcated and shows a pronounced, thick “triple-line” pattern associated with a higher probability of implantation following embryo transfer.

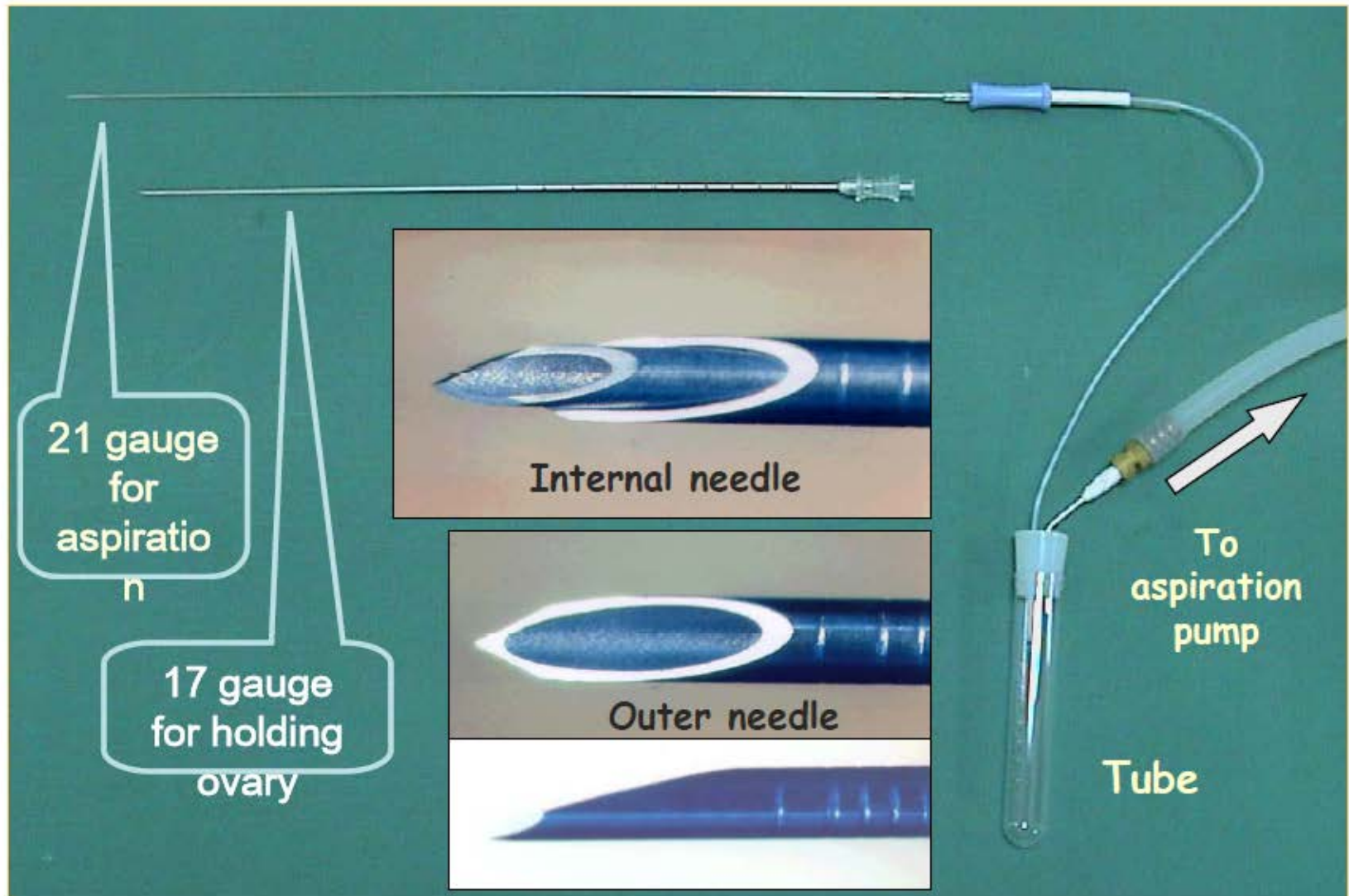
Punkcja do IVM

- Aby nie uszkadzać niedojrzałych oocytów z otaczających je komórek ziarnistych zaleca się stosowanie niskiego ciśnienia ssącego podczas punkcji – między 50 a 80 mm Hg (podczas gdy do IVF-u używa się ciśnienia z zakresu 80 – 100 mm Hg)
- Probówki, do których trafia pobierane oocyty, zawierają zazwyczaj 2 ml podłoża z dodatkiem heparyny (FM – flushing medium) i znajdują się w odpowiednich temperaturowo warunkach (zbliżonych do temperatury ciała). Podłoże z dodatkiem heparyny jest również używane do przepłukiwania igły przed i po zabiegu [153]. Zaleca się również płukanie igły w trakcie pobierania oocytów, by zapobiec ewentualnemu jej zablokowaniu
- Przed punkcją jajników od pacjentki pobiera się krew, by uzyskać surowice, które później zostanie dodane do medium hodowlanego, w którym prowadzone będzie dojrzewanie oocytów.



IVF JAPAN

IVF Osaka IVM Needle





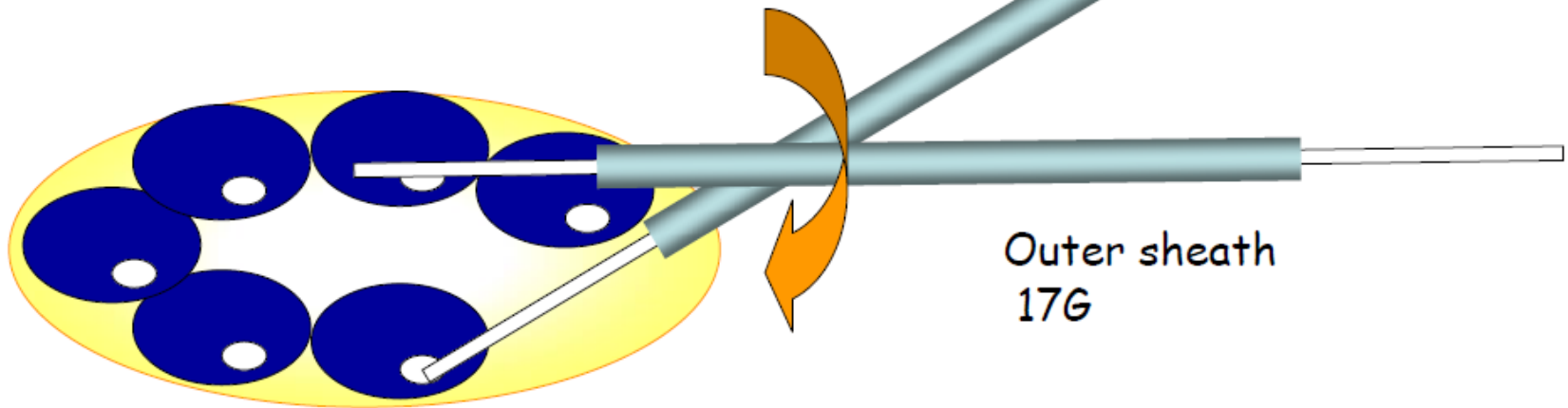
IVF JAPAN

How to retrieve immature oocytes

Aspiration pressure
100 or 200 mmHg

Inner sheath
21G

Outer sheath
17G



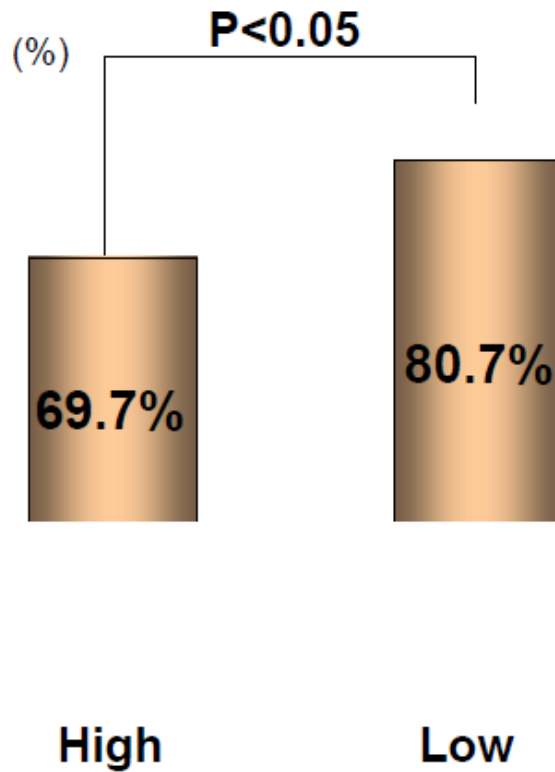
Kitazato Supply, Co Ltd



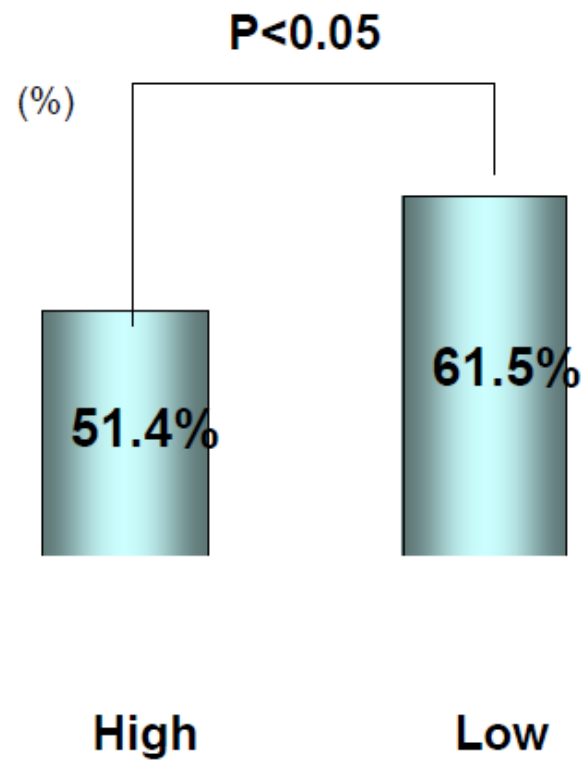
IVF JAPAN

Aspiration pressure

Quality of embryos



Maturation rate



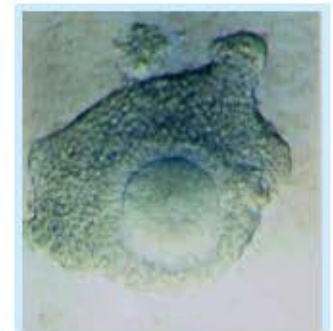
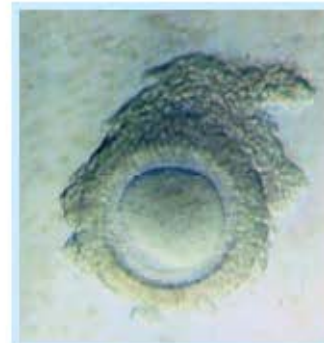
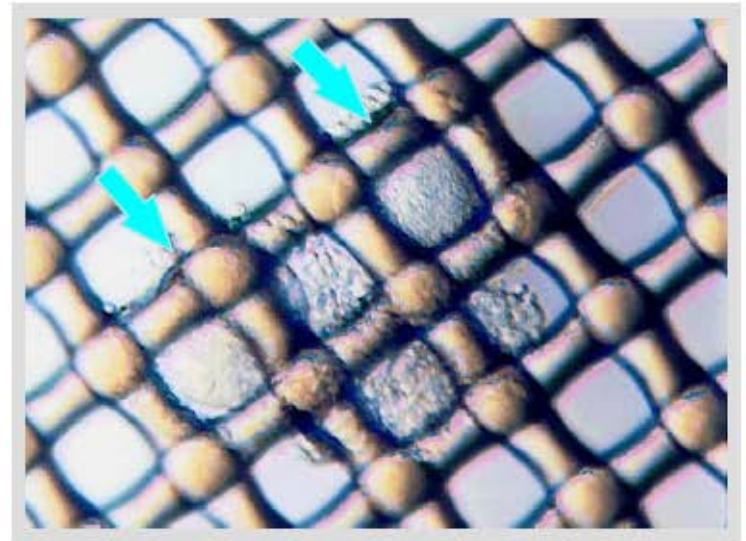
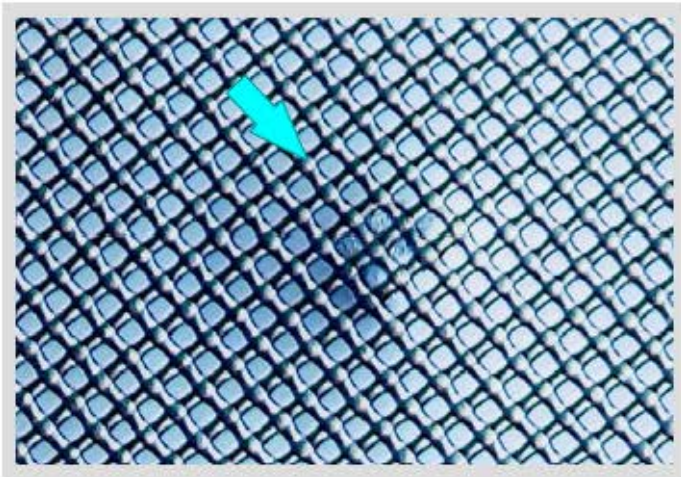
Hashimoto S, RBM Online 2007

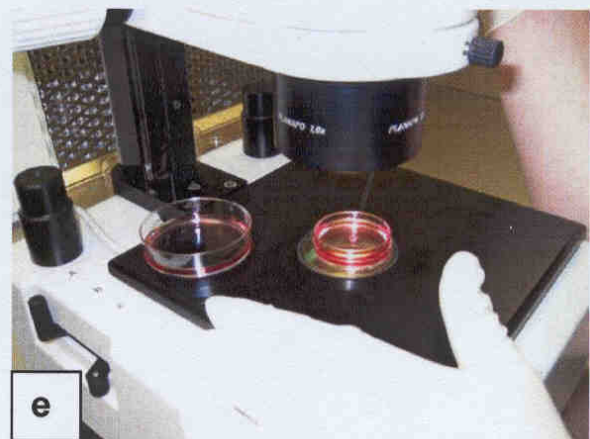
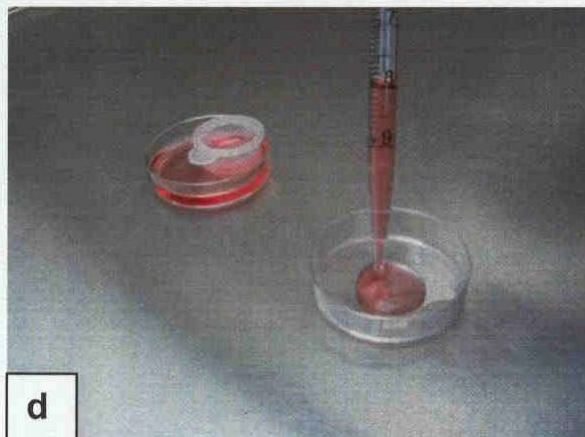
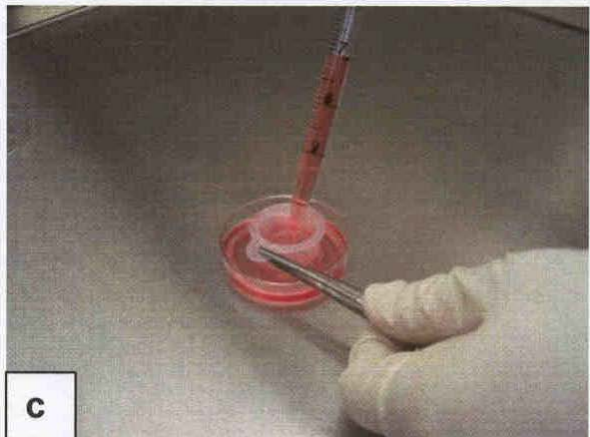
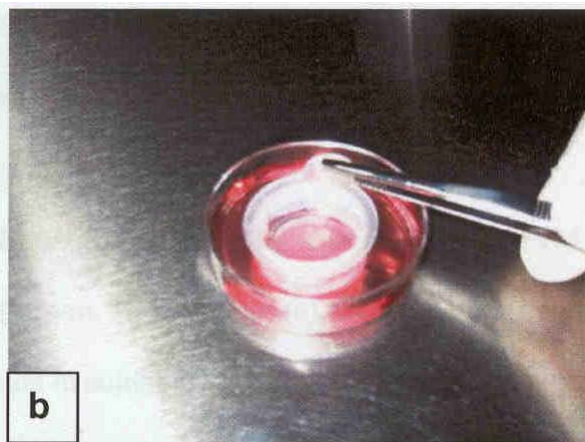
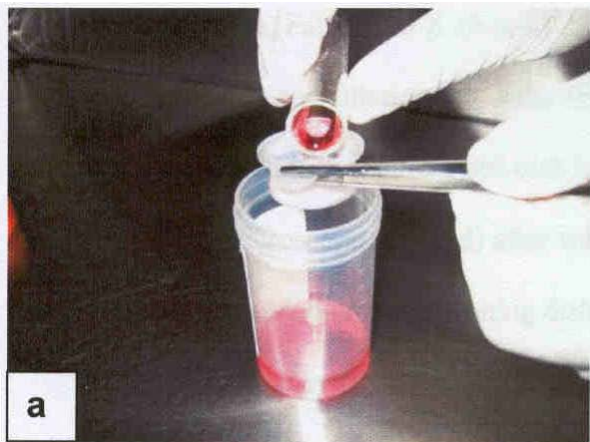


IVF JAPAN

Cell strainer assisted

Falcon 2350, Mesh 70 μm





Izolacja
i zakładanie hodowli
KOWJ

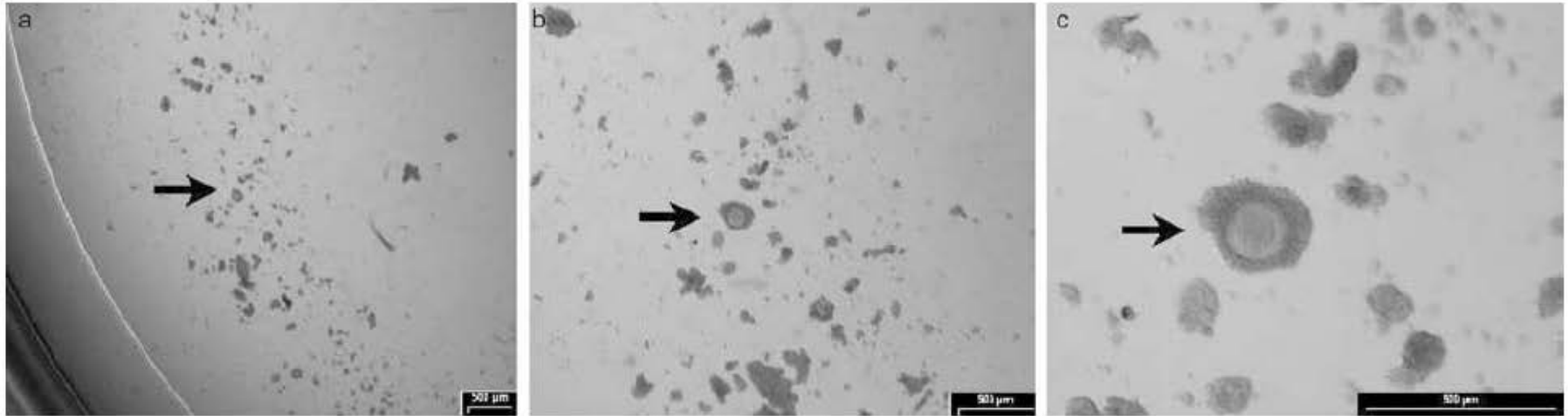


Fig 9.11 After follicle fluid aspiration, a cumulus–corona–oocyte complex (COC) has to be found floating between other granulosa cell debris (arrow). Arrow in (a), (b), and (c) shows the COC from low to large magnification as visualized under the stereomicroscope. Bar is 500 μm.

Ocena jakości oocytów do IVM

- Podczas wyboru oocytów nadających się do IVM-u, należy pamiętać że szukamy oocytów niedojrzałych, których morfologia jest inna niż tych dojrzałych, nadających się do IVF-u.
- Głównym kryterium według którego oceniane są oocyty to morfologia otaczających je komórek wzgórka jajonośnego. Ważne by komórki na całej powierzchni otaczały oocyt. Do wykorzystania w metodzie IVM najbardziej nadają się oocyty, które są bardzo szczelnie otoczone komórkami somatycznymi.
- Stopień rozwoju komórek wzgórka jajonośnego i budowa ich warstwy mogą wpływać na dalsze kompetencje rozwojowe oocytu
- Po przeprowadzeniu punkcji jajnika uzyskane kompleksy oocyt-wzgórek jajonośny możemy przesiać przez sito o porach wielkości 70 μm by móc łatwiej zidentyfikować i ocenić oocyty. Należy także uważnie kontrolować pH i temperaturę procesu, podczas tych kroków, by zapewnić prawidłową produkcję białek w oocycie i podtrzymać stabilną morfologię wrzeciona meiotycznego. Manipulacje te są bardziej czasochłonne, niż analogiczne wykonywane przy standardowym IVF-ie.

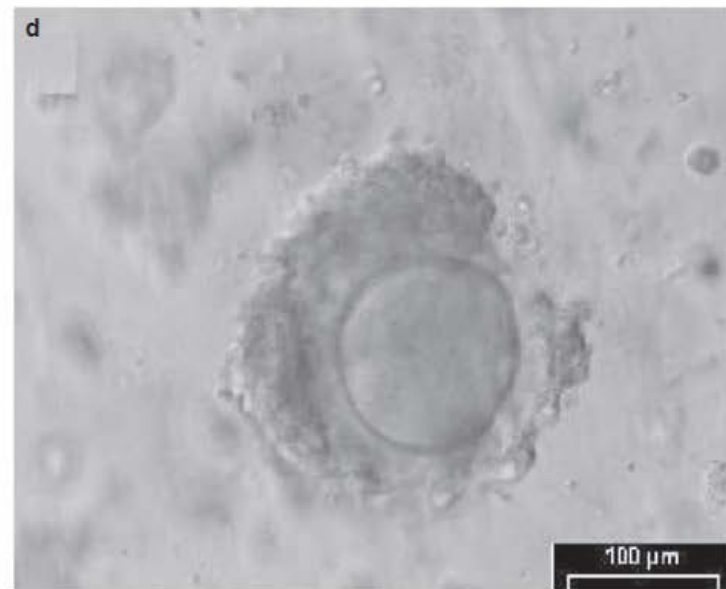
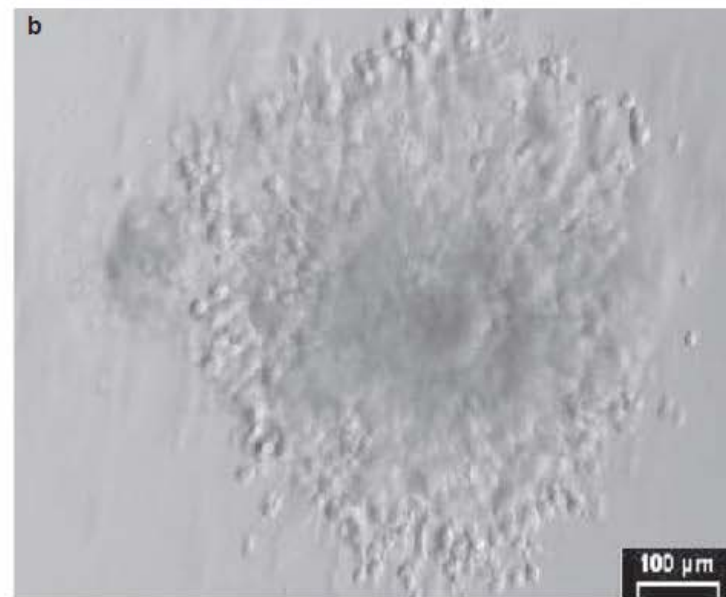
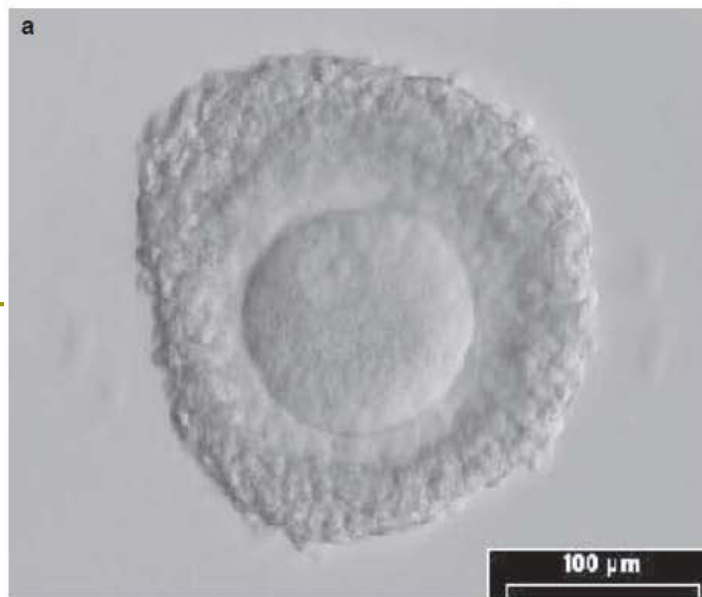


Fig 9.12 Classification of cumulus–corona–oocyte complex (COC) retrieved from small antral follicles. (a) CM1, CEO, CO2: the oocyte is surrounded by a compact mass of four to five layers of granulosa cells. The germinal vesicle is clearly visible within the oocyte at a peripheral position. (b) CM1, CE2, CO2: there is expansion of the distal layer of granulosa cells (cumulus), the proximal granulosa cells surrounding the oocyte are still compacted. (c) CM1, CE1, CO2: there is expansion of both distal (cumulus) and proximal (corona cells) layers of granulosa cells. (d) Distal granulosa cells are dispersed. The oocyte is partially naked and connections between cumulus cells and oocytes are lost.

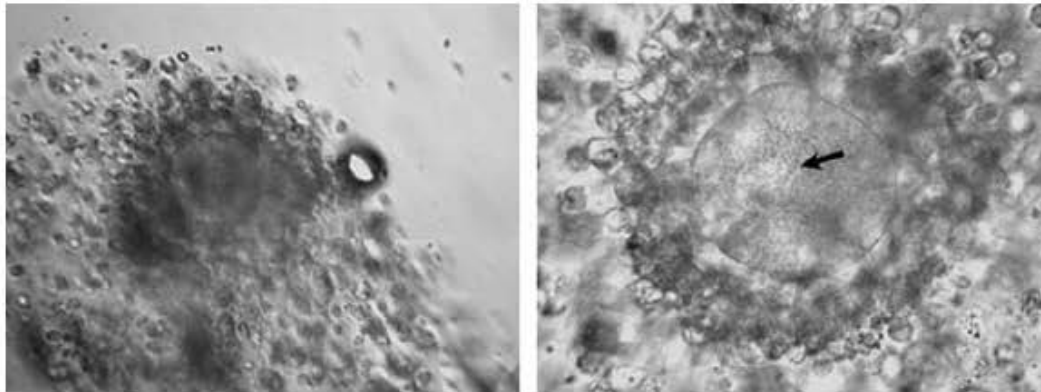


Fig 9.13 Photomicrograph of a cumulus–oocyte complex with an expanded cell morphology pattern (CM2, CE2, CO2). (a) Nuclear maturity of oocyte is not visible under an inverted microscope. (b) After cell ‘spreading,’ the GV is visualized within the ooplasm (arrow).

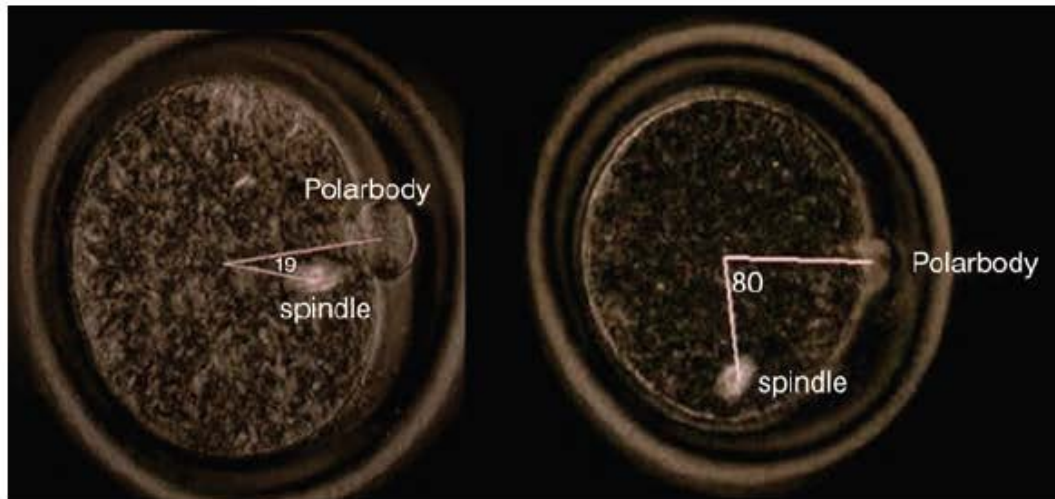


Fig 9.14 Spindle images of human in vitro matured oocytes using the PolScope software showing different locations of spindle in the ooplasm in relation to polar body position. (Courtesy of Lin Liu and David Keefe, University of Florida, Florida.)

Table 7.1 Oocyte–corona–cumulus complex evaluation scheme

Groups	OCCC morphology
Mature	Expanded cumulus Radiant corona Distinct zona pellucida, clear ooplasm Expanded well-aggregated membrana granulosa cells
Approximately mature	Expanded cumulus mass Slightly compact corona radiata Expanded well-aggregated membrana granulosa cells
Immature	Dense compact cumulus if present Adherent compact layer of corona cells Ooplasm if visible with the presence of germinal vesicle Compact and non-aggregated membrana granulosa cells
Post-mature	Expanded cumulus with clumps Radiant corona radiata, yet often clumped, irregular, or incomplete Visible zona, slightly granular or dark ooplasm Small and relatively nonaggregated membrana granulosa cells
Atretic	Rarely with associated cumulus mass Clumped and very irregular corona radiata if present Visible zona, dark and frequently misshapen ooplasm Membrana granulosa cells with very small clumps of cells

Adapted from Lin et al.⁹⁵

Table 9.5 **Maternity grading of cumulus–oocyte complexes (COCs) and oocyte (after cumulus–corona denudation) during prematuration days in culture**

1. *Grading of granulosa cell mass: cumulus expansion and oocyte coverage*

Cumulus mass (CM):

3 or fewer layers of cumulus cells	(CM0)
more than 3 but fewer than 10 layers of cumulus cells	(CM1)
10 or more layers of cumulus cells	(CM2)

Cumulus expansion (CE):

tight, dense cells	(CE0)
moderate expansion of cells	(CE1)
fully expanded cells	(CE2)

Contact (CO) between cumulus cells and oocyte:

naked	(CO0)
partially naked	(CO1)
fully enclosed	(CO2)
fully enclosed and part of follicle wall	(CO3)

2. *Assessment of oocyte nuclear maturation stage*

GV

GVBD

PB

3. *Assessment of oocyte morphology*

Oocyte diameter (μm)

Oocyte cytoplasm

presence of inclusions:

vacuoles/refractile bodies

darkness:

clear/dark

granularity:

homogeneous/granular

Zona:

normal/abnormal

Perivitelline space:

normal/enlarged

Oocyte shape:

regular/irregular

Polar body:

intact/fragmented

GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body

IVM oocytów ludzkich 1

- **a) Czas hodowli**
- Natychmiast po pobraniu otoczone komórkami ziarnistymi oocyty są umiejscawiane w specjalnym medium do IVM-u.
- IVM wymaga dojrzewania oocytów przez 24 do 30h przed zapłodnieniem. Nie należy jednak wydłużać czasu hodowli, gdyż wykazano, że oocyty, które dojrzewają w medium hodowlanym przez 30h są rozwojowo bardziej kompetentne niż te które wymagają dłuższego czasu hodowli.
- Proces dojrzewania *in vitro* przebiega szybciej niż fizjologiczny proces *in vivo* i trwa od 24 do 36 godzin. Wykazano, że z reguły prawie 50% oocytów osiąga swoją dojrzałość w hodowli *in vitro* już w przeciągu 24-28h.
- Wewnątrz jajnika natomiast oocyty dojrzewają w czasie minimum 48 h. Ważne więc by w laboratorium zapewnić im odpowiednie warunki –tak by zrekompensować skrócony czas dojrzewania i by na pewno został dokończony proces dojrzewania cytoplazmatycznego.



Fig 7.8 Giant oocyte (arrow) and normally sized oocyte. (Magnification 400x.)



Fig 7.9 Metaphase II oocytes obtained after ovarian hyperstimulation, all with approximately the same morphological appearance. (Magnification 400x.)

IVM oocytów ludzkich 2

b) Skład medium hodowlanego

- Nadal nie określono jednego, idealnego składu pożywki umożliwiającej dojrzewanie oocytów *in vitro*. Dysponujemy różnymi odmianami mediów hodowlanych, które wspólnie przebadano przeprowadzając badania oceniające ich skuteczność i umożliwiające ich porównanie
- Po latach doświadczeń przygotowano medium, które odpowiada większości zapotrzebowaniom ludzkich oocytów i umożliwia ich prawidłową hodowlę. Medium to nazwano po prostu medium do dojrzewania ludzkich oocytów (HOM – human oocytes maturation medium).

Składnik:	Stężenie:
NaCl	105 mmol/l
KCl	5.5 mmol/l
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0.5 mmol/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1.8 mmol/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1.0 mmol/l
NaHCO ₃	25.0 mmol/l
2-hydroksypropanol sodu (NaC ₃ H ₅ O ₃)	3.0 mmol/l
Pirogronian sodu	0.3 mmol/l
Glukoza	5.5 mmol/l
Glutamina	1.0 mmol/l
Tauryna	0.1 mmol/l
Cysteina	0.1 mmol/l
Cystamina	0.5 mmol/l
EAA (essential amino acids)	(1 x) ^a
NEAA (non-essential amino acids)	(2 x) ^a
Penicylina, Streptomycyna	0.06 g/l, 0.05 g/l
EDTA	0.1 mmol/l
Witaminy	(0.1 x) ^a
Albumina z surowicy ludzkiej (HSA)	2 mg/l
Rekombinant FSH	0.1 iu/ml
Rekombinant LH	0.5 iu/ml
Estradiol	1 µl/ml
EGF (epidermal growth factor)	10 ng/ml
ITS (insulin transferrin sodium selenite)	10µl na 10 ml

Czynniki dodawane do medium do IVM-u, promujące dojrzewanie oocytów	Autor	Rok
FSH	Izydar i wsp. Ali & Sirard	1998 2002b, 2005
Sp-cAMPS (aktywator PKA)	Ali & Sirard	2005
PMA (aktywator PKC)	Ali & Sirard	2005
Estradiol	Tesarik & Mendoza Ali & Sirard	1995 2002b
Hormon wzrostu (GH)	Iga i wsp. Izydar w wsp.	1998 1998
Kwas hialuronowy (HA)	Ali i wsp.	2002
Płyn pęcherzykowy (FF)	Sirard i wsp. Blondin i wsp. Ali i wsp.	1995 2002 2004
Surowica krwi	Trounson i wsp.	2001
Antyoksydanty (cysteina, cystamina, glutamina, β -mekraptoetanol)	Jeong & Yang Ali i wsp.	2001 2003



Products

8221 4010 MediCult IVM® System,
LAG Medium (10 ml) (Vial 1)
IVM® Medium (10 ml) (Vial 2 x 3)

Vial 1: The LAG Medium is for preincubation of immature oocytes

Vial 2: The IVM® Medium is a basal medium for maturing immature oocytes with supplements

MediCult IVM® is for use

- in healthy regularly cycling women referred due to male factor and/or tubal disease
- women with PCO

Composition

Vial 1, LAG Medium:

- Synthetic Serum Replacement (SSR®) (USA: ART Supplement)
- Physiological salts
- Human serum albumin (HSA)
- Glucose
- Sodium pyruvate
- Sodium bicarbonate
- Penicillin
- Streptomycin
- Phenol Red

Vial 2, IVM® Medium:

- Glucose
- Sodium Pyruvate
- Sodium Acetate
- Cholesterol
- Physiological salts
- Amino acids
- Nucleotides
- Vitamins
- Sodium bicarbonate
- Penicillin
- Streptomycin
- Phenol Red



IVF JAPAN

Medium for IVM -Medicult

- Vial 1(Lag medium)
for preincubation
- Vial 2(IVM Medium)
a basal medium for maturing immature
oocyte with supplements



IVF JAPAN

Medium for IVM -Medicult

- Vial 2, IVM Medium

Glucose and derived metabolism

Physiological salts

Essential amino acids

Non-essential amino acid

Vitamins

DNA bases

Sodium pyruvate

Sodium bicarbonate

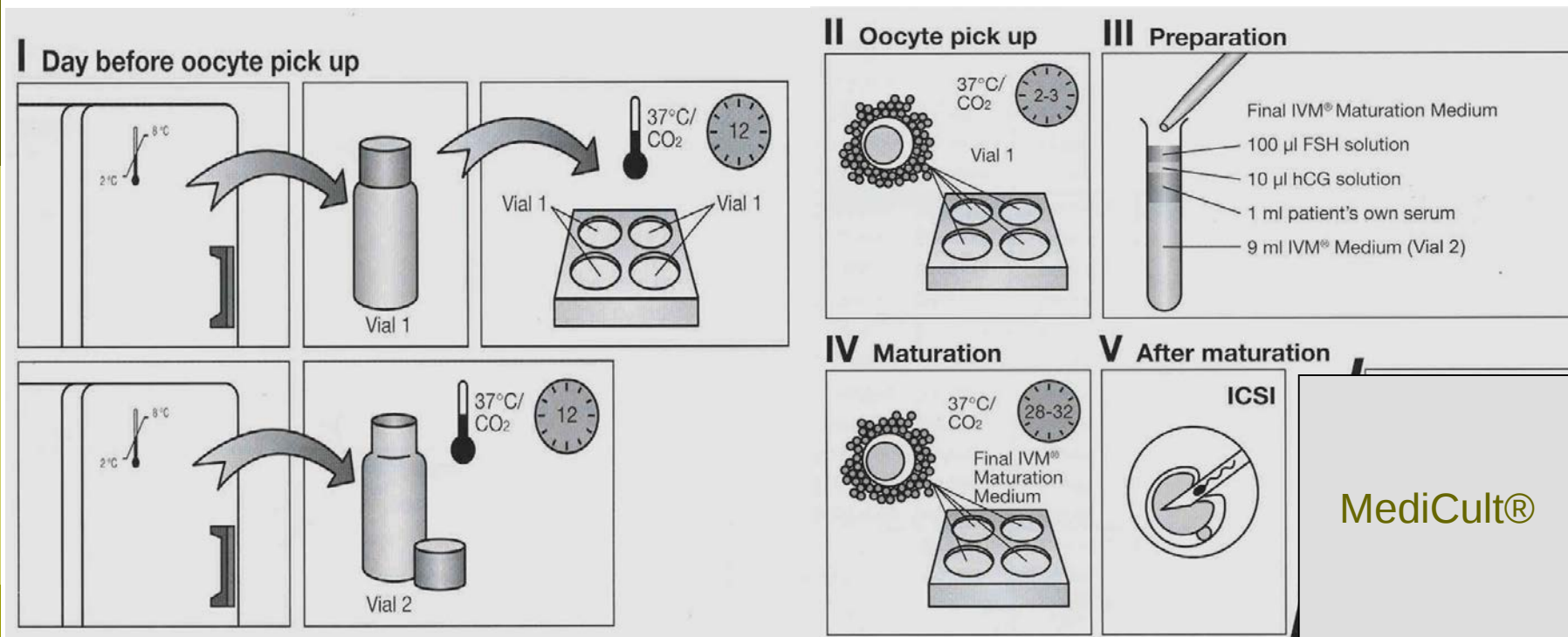
Streptomycin 50mg/l

Penicillin 50000IU/l

Phenol Red

IVM System (protokół laboratoryjny)

Final IVM maturation medium



OPU



LAG medium
2 – 3 h

Denudacja



IVM medium
26 h

ICSI



SPM
2 h

ET



ISM
42-44 h

TYPES OF IVM

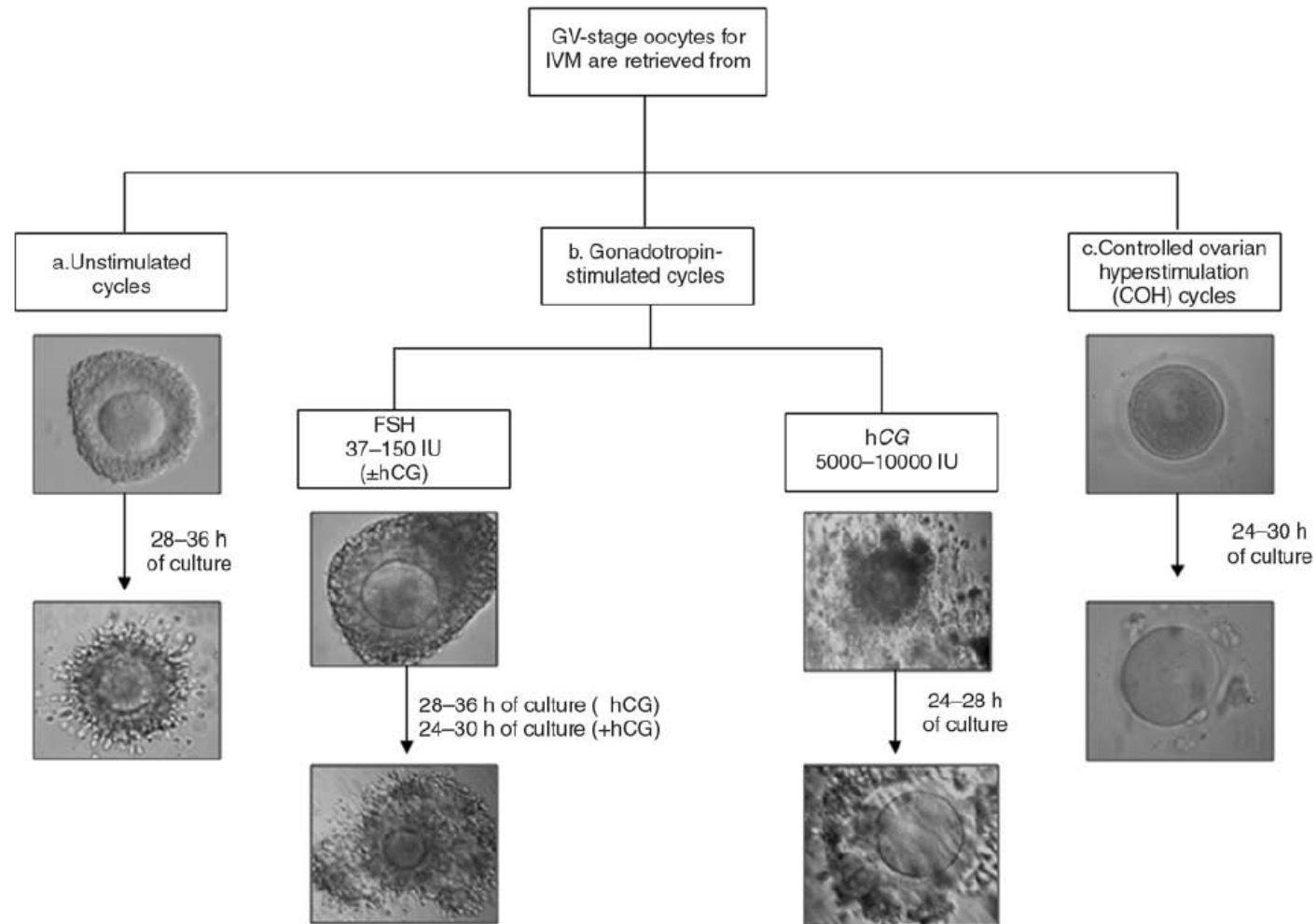
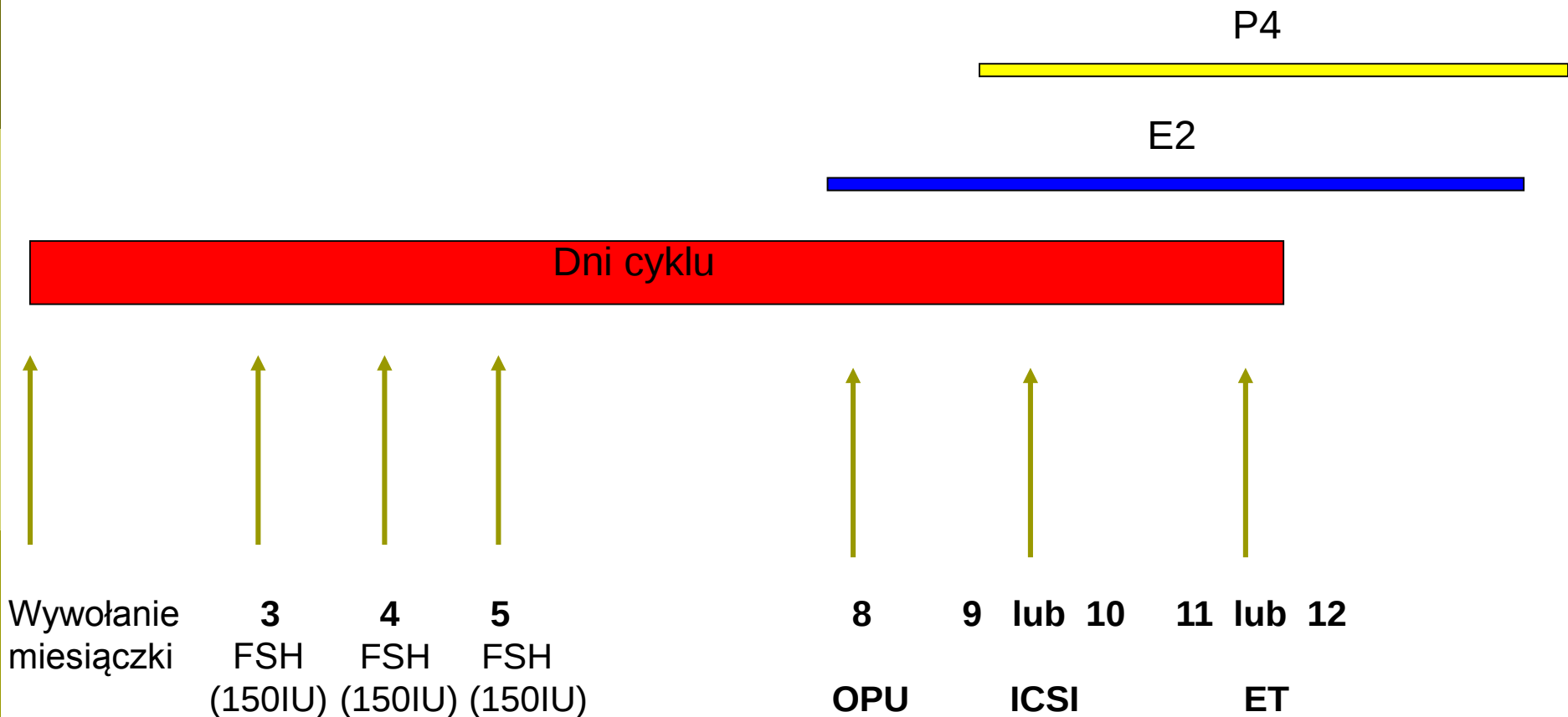


Fig 9.10 Diagram representing the diversified IVM clinical protocols applied in PCO, PCOS, or normo-ovulatory women. These protocols reflect on morphology and maturation timing of oocytes retrieved. (a) Immature oocytes are retrieved prior to the formation of a dominant follicle during a natural cycle: oocytes retrieved are enclosed in a compact mass of cumulus cells and the majority of the oocytes reach maturation between 28 h and 36 hours of culture. (b) Immature oocytes are collected following a mild stimulation: from patients primed only with FSH, the oocytes retrieved have a full compacted cell morphology and the majority of oocytes mature within 28–36 hours of culture; with the administration of hCG with or without FSH priming, maturation is more rapid, within 24–30 hours of culture, and the oocytes retrieved from the most advanced follicles have a more expanded cell morphology. (c) Immature oocytes collected from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF/ICSI treatment are often in vitro matured in the absence of adjacent surrounding granulosa cells and the majority of the oocytes mature within a time frame of 24–30 hours.

IVM – protokół kliniczny





IVF JAPAN

Protocol of IVM

Oocyte collection **ICSI**

Embryo transfer



Culture



↑
Ultrasonogram

Estrogen patch 6 mg every other day

↑
HCG 10,000 I.U.(36 hrs prior to OPU)



Progesterone 50 mg im

