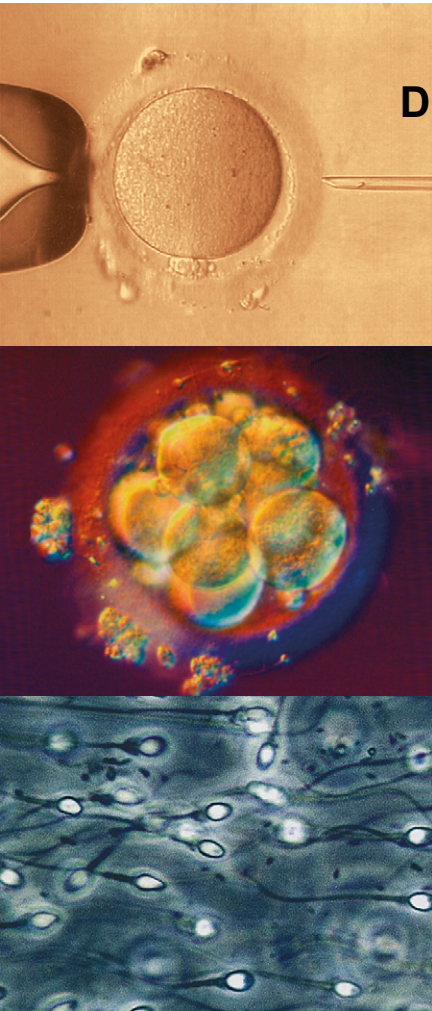


Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Die Bedeutung der Analyse der Metaphase-II-Spindel in der assistierten Reproduktion

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2005; 2 (2), 78-83

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz



ENDO FERTI FORUM

ENDOKRINOLOGIE & FERTILITÄT
FÜR KLINIK & PRAXIS

20.-21. März 2026

Universitätsmedizin Mainz

Einladung zu unserer wissenschaftlichen Veranstaltung Endo-Ferti-Forum

Brücke(n) zwischen Unikliniken und Praxen an Rhein und Main(z)

– die aus dem bisherigen Format „Ferti Forum“ ab 2026 hervorgeht –



Freuen Sie sich auf spannende Vorträge und den lebendigen Austausch mit Kolleg:innen und Expert:innen aus Klinik und Praxis. Freitagabend laden wir Sie herzlich zu einem entspannten Empfang ein – eine perfekte Gelegenheit, Kontakte zu knüpfen und den Tag genussvoll ausklingen zu lassen.

Wissenschaftliche Leitung: Univ.-Professorin Annette Hasenburg, Dr. Susanne Theis, Universitätsmedizin Mainz, Sanitätsrat Dr. Werner Harlfinger, BVF Rheinland-Pfalz Dr. Rüdiger Gaase, BVF Hessen Dr. Klaus J. Doubek

Schirmherrschaften: Prof. Nicole Sänger, Uniklinik Bonn, Prof. Jan-Steffen Krüssel, Uniklinik Düsseldorf, Dr. Annette Bachmann, Uniklinik Frankfurt am Main, Prof. Christine Skala, Uniklinik Köln

Weitere Informationen
& Anmeldung unter



Die Bedeutung der Analyse der Metaphase-II-Spindel in der assistierten Reproduktion

T. Ebner, M. Moser, M. Sommergruber, G. Tews

Die meiotische Spindel ist für die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte sowie für ihre korrekte Verteilung während der meiotischen Teilungen verantwortlich. Sie ist aus Mikrotubuli aufgebaut und daher besonders anfällig für Temperaturschwankungen und andere negative Einflüsse der Kulturbedingungen. Darüber hinaus stellt im IVF-Labor die invasive ICSI-Technik ein Problem dar, da die nicht sichtbare Metaphase-spindel theoretisch durch die Injektionspipette verletzt werden könnte. Mittels Polscopes kann die Spindel aber nichtinvasiv dargestellt werden, was erstens jegliche direkte Beeinträchtigung durch die ICSI-Technik verhindert und zweitens als zusätzliches Auswahlkriterium für den Embryotransfer herangezogen werden kann. ICSI und andere Techniken (In vitro-Maturation, Kryokonservierung) können also in Spindelanomalien resultieren, welche wiederum zu einer fehlerhaften Chromosomenverteilung führt. Daher sollte jeder Embryologe danach trachten, den Streß auf den Spindelapparat möglichst niedrig zu halten.

Schlüsselwörter: Metaphasespindel, Polscope, ICSI, Kryokonservierung, In vitro-Maturation

The meiotic spindle is responsible for the arrangement of the chromosomes on the metaphase plate and for normal segregation after meiosis. It consists of microtubuli and is particular susceptible for any deviation from optimal culture conditions (e.g. fluctuations in temperature). In IVF-laboratories the highly invasive ICSI-technique may cause additional problems, since the metaphase spindle could be harmed irreversibly by the injection pipette. By means of the Polscope spindles can be visualized non-invasively resulting in minimal stress caused by the ICSI-technique and improved selection for embryo transfer. ICSI and other assisted reproductive technologies (in vitro maturation, cryopreservation) can lead to anomalies in spindle morphology and integrity, which might cause chromosomal imbalance. Therefore, the aim of every embryologist should be to significantly limit the stress to the meiotic spindle apparatus. J Reproduktionsmed Endokrinol 2005; 2 (2): 78–83.

Key words: metaphase spindle, Polscope, ICSI, cryopreservation, in vitro maturation

Die meiotische Spindel ist für die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte sowie für ihre korrekte Verteilung während der meiotischen Teilungen verantwortlich. Sie ist aus Mikrotubuli aufgebaut, also aus nicht kovalenten polaren Heterodimeren von α - bzw. β -Tubulin [1]. Eine longitudinale Anordnung der Tubulindimere erlaubt die Bildung von sogenannten Protofilamenten, welche sich wiederum in Gruppen von 12–15 zu 25 nm-Röhren aneinanderlagern.

Innerhalb dieser Mikrotubuli gibt es sowohl eine strukturelle als auch eine funktionelle Polarität, wobei einem langsam polymerisierenden Minuspol (α -Tubulin), der am Spindelpol ansetzt, ein rascher wachsender Pluspol gegenübersteht (β -Tubulin), welcher wiederum Kontakt zu den Kinetochoren der Chromatiden herstellt [2, 3]. In einer funktioniellen Spindel modulieren spezifische Proteine (z. B. MAP, Kinesin) die dynamische Instabilität der Mikrotubuli, indem sie Nukleotide (GTP) hydrolysieren und so die Energie für eine Mikrotubuliveränderung zur Verfügung stellen. Die Spindelorganisation hingegen ist von der Aktivität von ATPase-Motorproteinen (z. B. Dynein) abhängig, welche zu Transport und Anordnung wichtiger Spindelkomponenten wesentlich beitragen.

In vivo findet die Bildung von Mikrotubuli in Gegenwart relativ niedriger Tubulinkonzentrationen an sogenannten Mikrotubulus-organisierenden Zentren (MTOC) statt [4]. Bei vielen Säugeroozyten findet man nicht die typische paarige Anordnung von MTOCs bzw. Zentriolen, sondern vielmehr eine von den Chromosomen rekrutierte größere Anzahl von zentriolfreien MTOCs [5]. Dies führt im Gegensatz zu mitotischen Spindeln (aber auch zu den Spindeln in den Spermien) zu einer charakteristischen

Form der meiotischen Spindel, mit also eher flachen Polen und relativ wenigen Tubuli, die ins Ooplasma ragen.

Negative Einflüsse auf die Spindelstruktur

Die Enden der einzelnen Mikrotubuli sind ständig wechselnden Phasen von Wachstum bzw. Rückbildung ausgesetzt und aufgrund des komplizierten Aufbaus der meiotischen Spindel bzw. ihrer komplexen Funktion verwundet es nicht, daß schon geringste Veränderungen der Kulturbedingungen zu nachhaltenden Veränderungen derselben führen können.

Es wird, zumindest im natürlichen Zyklus, vermutet, daß ein erhöhtes mütterliches Alter mit der Rate an abnormen Spindeln korreliert [6], jedoch scheint sich dies im stimulierten Zyklus nicht zu bewahrheiten [7, 8]. Ein möglicher Grund wäre ein IVF-Kollektiv, dessen biologisches Alter nicht unbedingt mit dem reproduktiven Alter übereinstimmt. Zuletzt wurde jedoch wieder eine deutliche Abnahme der Spindeldarstellbarkeit bei Patientinnen über 40 Jahren (ca. 20 %) berichtet [9].

Aber nicht nur das mütterliche Alter, sondern auch das postovulatorische Alter der Eizelle selbst kann sich negativ auf die Spindelmorphologie auswirken. Daß beim Menschen [10], im Gegensatz zur Maus [11], mit zunehmendem postovulatorischen Alter der Eizelle häufiger verkürzte oder asymmetrische Spindeln nachweisbar sind, hängt wohl mit der Tatsache zusammen, daß sich bei der kleineren Primatenspindel Veränderungen der Mikrotubulistruktur schneller bemerkbar machen als bei der deutlich größeren meiotischen Spindel in Mäuseoocyten [12].

Zumindest im Tiermodell hat es auch den Anschein, als ob wiederholte ovarielle Hyperstimulationen kausal mit dem vermehrten Auftreten von Spindeldefekten in Zusammenhang stehen [13].

Darüber hinaus existieren chemische Substanzen (z. B. Nocodazol), welche in höheren Dosen die meiotische

Eingegangen: 15.03.2005; akzeptiert nach Revision: 15.04.2005

Aus der Landes-Frauen- und Kinderklinik Linz, IVF-Abteilung, Linz, Österreich

Korrespondenzadresse: Univ.-Doz. Mag. Dr. rer. nat. Thomas Ebner, Landes-Frauen- und Kinderklinik Linz, IVF-Institut, A-4020 Linz, Lederergasse 47; E-Mail: thomas.ebner@gespag.at

Spindel depolymerisieren und so zu Wachstumsstop oder Aneuploidie führen können [12, 14]. Ähnlich gelagert scheint die Situation bei starken Raucherinnen zu sein, denn es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an Zigaretten pro Tag und der Rate an diploiden Oozyten gezeigt [15]. Da bekannt ist, daß Alkaloide (z. B. Nikotin) an Tubulin binden können [16], erklärt sich so die schädigende Wirkung.

Neben patientenbezogenen und Umweltfaktoren kommt auch den Kulturbedingungen enorme Bedeutung für die Intaktheit des Spindelapparates zu. So ist die besondere Empfindlichkeit der meiotischen Säugerspindel, inklusive der des Menschen, gegenüber Temperaturschwankungen schon früher hervorgehoben worden [17–21]. Schon eine geringfügige Erwärmung um wenige Grad (von 37 °C auf 40 °C) kann eine Reduktion der Mikrotubulizahl sowie eine Dislokation der Spindel bedingen [22]. Andererseits zeigte sich, daß schon kurzzeitige (ca. 1,5 Minuten) Temperaturniedrigungen (von 37 °C auf 32 °C) zu einer, wenn auch noch reversiblen, Depolymerisation des Spindelapparates führen. Dauerte dieser Temperaturabfall länger an, z. B. 10 Minuten bei Raumtemperatur, konnte sich die Spindel nicht mehr vollständig erholen [23].

Diese extreme Temperaturempfindlichkeit der Eizellen, insbesondere der meiotischen Spindel, verdeutlicht, wie wichtig eine genaue Temperaturkontrolle während der Manipulationen der Gameten ist [24]. So konnten Wang und Mitarbeiter [24] durch zusätzliches Verwenden einer beheizten Objektivlinse eine Temperatur von $37 \pm 0,1$ °C garantieren, während die Temperatur während einer herkömmlichen ICSI, also unter alleiniger Verwendung eines beheizten Objektisches, auf 33–34 °C absank. Diese zusätzliche Einrichtung führte in weiterer Folge zu einem deutlich erhöhten Spindelnachweis (81,2 % vs. 61,4 %), zu einer höheren Befruchtungsrate (78,8 % vs. 56,7 %), aber auch zu besseren klinischen Schwangerschaftsraten (51,7 % vs. 25,0 %).

Darüber hinaus scheint die Teilungsspindel in der kritischen Phase der finalen Eizellreifung besonders anfällig für einen Sauerstoffmangel zu sein, zumindest wenn man einer Publikation Glauben schenkt, welche Kulturen mit 20 % bzw. 5 % Sauerstoff miteinander vergleicht [25]. Weiters zeigt sich die Metaphase-II-Spindel besonders sensitiv gegenüber osmotischen Schwankungen. Sowohl hypo- als auch hyperosmotische Bedingungen resultieren in einer weitgehenden Zerstörung des Spindelapparates [26].

Eine theoretische Gefahr droht der Teilungsspindel jedoch nicht nur von widrigen Kulturbedingungen, sondern auch von den relativ invasiven Manipulationen während einer ICSI [12].

Erstes Polkörperchen und meiotische Spindel

Bis dato mußte man sich darauf verlassen, daß die Lage des ersten Polkörpers gleichzeitig die Lage der meiotischen Spindel anzeigt, weshalb während des Anstechens die Eizelle so arretiert wird, daß das erste Polkörperchen einen größtmöglichen Abstand zur Einstichstelle aufweist (90°). Nichtsdestotrotz scheinen nahezu alle von der Norm [27] abweichenden Konstellationen annähernde gleiche Ergebnisse zu liefern, solange das erste Polkörperchen nicht der Einstichstelle genau gegenüberliegt [28].

Diese Beobachtung ist wohl zum Teil darauf zurückzuführen, daß sich die MII-Spindel nicht immer in unmittelbarer Nähe des ersten Polkörperchens befindet, wie an Säugetieroozyten aufgezeigt werden konnte [29, 30]. Auch für den Menschen zeigten sich zum Teil drastische Abweichungen von dem Idealbild einer reifen Eizelle, in der Polkörperchen und Spindel eng beieinander liegen [31]. Betrachtet man diese Daten näher, so stellt man fest, daß der mittlere Abweichungswinkel zwischen Polkörperchen und meiotischer Spindel an die 30° betrug und knapp 40 % der Eizellen sogar noch stärkere Dislokationen aufwiesen.

Da Payne et al. [32] mittels Zeitrafferaufnahmen dokumentieren konnten, daß, trotz nicht unbeträchtlicher Zytoplasmarotationen, die Position der Metaphasenplatte nahezu unveränderlich blieb, muß das erste Polkörperchen seine ursprüngliche Lage verändert haben. Da hier im Gegensatz zum zweiten Polkörperchen keinerlei zytoplasmatische Verbindung mehr zur Eizelle besteht, können zu starke Manipulationen während des mechanischen Entfernens der Cumuluszellen die Position des ersten Polkörperchens nachhaltig verändern. Ein weiterer möglicher Grund wären dynamische Bewegungen des Oolemmas während und nach dem Abschnüren des ersten Polkörperchens [31].

Darüber hinaus konnten Hardarson und Mitarbeiter [31] zeigen, daß auch *in vitro* gereifte Oozyten (mit einer Cumuluszellpräparation vor dem Abschnüren des 1. Polkörperchens) sehr wohl auch deutliche Abweichung zwischen der Position der Spindel und des ersten Polkörperchens aufweisen können. Dies würde bedeuten, daß es sich teilweise um ein Problem der Eizelle selbst handelt, daß also eine deutliche Abweichung zwischen Spindel- und Polkörperposition als Eizell anomalie betrachtet werden muß [33].

Darstellung der meiotischen Spindel in MII-Oozyten

Jedenfalls hat es den Anschein, daß in nicht wenigen Fällen völlige Unkenntnis über die eigentliche Lage der meiotischen Spindel herrscht. In solchen Eizellen könnte die Injektionspipette den Spindelapparat teilweise verletzen oder auch völlig zerstören, sofern die eher rigide Spindel der Glasnadel nicht ohnehin ausweicht. Ist dies nicht der Fall, könnte es in weiterer Folge zu einer erhöhten Degenerationsrate [7], zu Fehlbefruchtungen [34] oder aber zu chromosomalen Fehlverteilungen führen.

Dieses Problem könnte umgangen werden, wenn zum Zeitpunkt der ICSI die aktuelle Position der Spindel bekannt wäre. Im routinemäßig verwendeten Durchlichtmikroskop (mit Hoffman- oder Nomarskikontrast) ist der Spindelapparat nicht sichtbar, nicht etwa weil er zu klein wäre, sondern mangels entsprechendem Kontrast. Es bedarf also anderer Methodiken, aber leider sind diese größtenteils invasiver Natur, d. h. die Eizellen müssen für die weitere immunhistochemische oder transelektronenmikroskopische Bearbeitung fixiert werden und sind somit für die klinische Anwendung in der IVF ungeeignet.

Kürzlich wurde jedoch ein Polarisationsmikroskop entwickelt, welches Phasenverschiebungsbilder höchster Auflösung liefert, ohne auf die Orientierung des Polarisators oder der zu untersuchenden Zelle angewiesen zu sein. Unter Verwendung eines steuerbaren Flüssigkristall-Pola-

risationsfilter können molekular geordnete Strukturen (z. B. meiotische Spindel, Zona pellucida) aufgrund ihrer doppelbrechenden Eigenschaften mit hohem Detailreichtum und Kontrast abgebildet werden [35–37]. Im Gegensatz zu bereits vorhandenen Polarisationsmikroskopen arbeitet dieses Polscope mit zirkulär polarisiertem anstatt mit linear polarisiertem Licht (Auflösung der Phasenverschiebung: 0,02–0,05 nm). So kann für jedes Bildelement eine Quantifizierung der Doppelbrechung (bei automatischer Hintergrundkorrektur) erfolgen. Da Kunststoffe in der Regel stark doppelbrechend sind, ist es unbedingt erforderlich, mit Glasschälchen zu arbeiten.

Aufgrund der Tatsache, daß das Polscope mit der gleichen Lichtintensität wie herkömmliche Mikroskope arbeitet und daß auch andere Mikroskope schon mit polarisiertem Licht arbeiten (Nomarskikонтраст), kann angenommen werden, daß die Spindelanalyse mittels polarisiertem Licht ein sicheres Verfahren ist. Tatsächlich legen erste Untersuchungen an Mäuseoozyten nahe [38], das Polscope als unbedenklich einzustufen.

ICSI mittels Polscope

Die ersten, die diese neue Technologie an menschlichen Eizellen anwandten, waren Wang et al. [7]. Wohl aufgrund methodischer Anlaufschwierigkeiten konnten sie jedoch nur in weniger als zwei Dritteln (61,4 %) aller Eizellen überhaupt eine Spindel darstellen (Abb. 1). Daß sich dieser Prozentsatz hoch signifikant ($p < 0,001$) von allen anderen bisherigen Polscopestudien unterscheidet (Tab. 1), ist höchstwahrscheinlich auf mangelndes Screening zurückzuführen, d. h. es wurde verabsäumt, die meiotische Spindel in mehreren Ebenen zu suchen [33]. Vermutlich hätte man durch Rotation des Gameten auch keine Spindeln beobachtet, die mitten im Ooplasma situiert zu sein schienen, anstatt, wie erwartet, fix an der Zellperipherie zu liegen [12, 32].

Nichtsdestotrotz deutete sich in dieser ersten Arbeit [7] erstmals an, daß die exakte Darstellbarkeit der MII-Spindel hinsichtlich der Fertilisierungsrate als prognostischer Marker dienen kann. Diese Beobachtung wurde von zahlreichen späteren Publikationen (Tab. 1) untermauert, die allesamt über niedrigere Befruchtungsraten berichteten, wenn die Spindel mittels Polscope nicht nachgewiesen werden konnte [8, 33, 34, 38]. Eine italienische Arbeitsgruppe [33] berichtete außerdem, daß trotz Vorhandenseins einer doppelbrechenden Spindel sehr wohl schlechtere Befruchtungsergebnisse zu erwarten sind ($p < 0,005$), wenn sich erster Polkörper und meiotische Spindel gegenüberliegen (50,0 %), anstatt eng beieinan-

der zu liegen (Abb. 2, 74,0 %). Es soll jedoch bemerkt werden, daß dieses Ergebnis im Widerspruch zu anderen Daten steht [34], die jedoch auf einer geringen Stichprobenanzahl basieren. Neben dem beschriebenen positiven Einfluß auf die Fertilisierung fanden Moon und Mitarbeiter [34] eine tendenzielle Zunahme an dreikernigen Zygoten (10,7 % vs. 5,9 %), die aus spindelnegativen Eizellen hervorgingen. Sie führten dies auf eine chromosomale Clusterbildung zurück.

Auch die weitere Entwicklung der spindelpositiven Eizellen bzw. der sich daraus entwickelnden Zygoten scheint im Vergleich zu Zellen ohne Spindel besser zu sein. So publizierten Wang et al. [8] eine signifikante Zunahme der Zellzahl am Tag 3 *in vitro*. Was die Qualität der Embryonen, also den Grad der Fragmentierung, angeht, ist sich die Wissenschaft noch uneins, ob sich eine darstellbare Spindel als positiver Prädiktor eignet [34, 40] oder nicht [33, 39].

Obwohl die Morphologie des Embryos am dritten Tag nicht unbedingt mit der Blastozystenbildungsrate einhergehen muß [41–43], wiesen Wang et al. [8] signifikant erhöhte Blastulationsraten nach ($p < 0,001$), je nach Nachweisbarkeit der meiotischen Spindel (51,9 % vs. 29,9 %).

Letzten Endes findet sich auch eine Arbeit [9], allerdings mit fragwürdigem Studiendesign, die einen Zusammenhang zwischen Schwangerschaftsrate und der Darstellbarkeit einer MII-Spindel herstellt. Leider haben diese Autoren die Polscopeergebnisse aller Oozyten gepoolt und nicht nur jene Eizellen ausgewertet, die sie in weiterer Folge auch transferiert haben.

In vitro-Maturation und Metaphase II-Spindel

Studien an Mäuseoozyten deuten an, daß bei einer *In vitro*-Maturation unreifer Eizellen aus Antralfollikeln trotz etablierter Kultursysteme [44–46] mit einer 2–3%igen Verringerung des Eizelldurchmessers zu rechnen ist, verglichen mit *in vivo* gereiften Gameten [25, 47]. Dieses Manko mag die beobachteten geringfügigen Veränderungen der Spindelstruktur erklären [47, 48]. Im Detail gewannen Hu et al. [25] den Eindruck eines eher quadratischen Spindelerscheinungsbildes. Diese Abweichung von der normalen eher „faßähnlichen“ Form ergibt sich durch eine Verkürzung der Spindel, sowie eines weniger kompaktierten Spindeläquators (im Vergleich zu Spin-

Tabelle 1: Darstellbarkeit der Metaphase-II-Spindel mittels Polscope und Einfluß auf die Befruchtungsraten.

Autoren	Spindel positiv	Spindel nahe 1. Polkörper	Befruchtungsraten	
			Spindel	keine
Wang et al. [7]	327/533 (61,4)	61 (18,7)	202 (61,8) ^a	91 (44,2) ^a
Wang et al. [8]	1266/1544 (82,0)	kD	879 (69,4) ^b	175 (62,9) ^b
Cooke et al. [40]	115/124 (92,7)	35 (30,4)	81 (70,4)	kD
Moon et al. [34]	523/626 (83,6)	252 (48,2)	444 (84,9) ^c	78 (75,7) ^c
Rienzi et al. [33]	484/532 (91,0)	254 (52,5)	362 (74,8) ^d	16 (33,3) ^d
Cohen et al. [39]	585/770 (76,0)	kD	413 (70,6) ^e	115 (62,2) ^e
Konc et al. [9]	320/428 (74,8)	31 (9,7)	235 (73,4)	kD

kD: keine Daten; Prozentsätze sind in Klammern angegeben; ^{a, b, c, e} $p < 0,05$; ^d $p < 0,001$

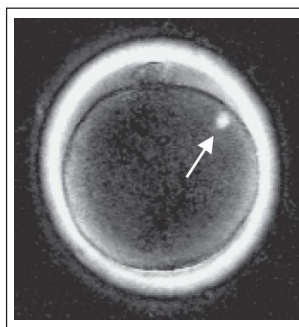


Abbildung 1: Polyscopeaufnahme einer dislozierten meiotischen Spindel (Pfeil, mit freundlicher Genehmigung L. Rienzi).

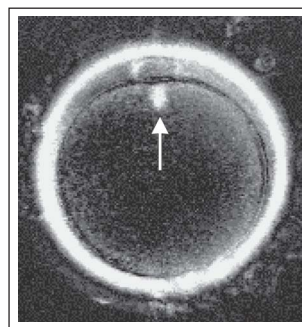


Abbildung 2: Polyscopeaufnahme der meiotischen Spindel (Pfeil), die sich in unmittelbarer Nähe des ersten Polkörperchens befindet (mit freundlicher Genehmigung P. Gaßner).

deln *in vivo* maturierter Oozyten). Obwohl sich also die Spindelform selbst morphologisch eher wenig verändert zeigte, fand sich ein negativer Zusammenhang zwischen einer prolongierten *In vitro*-Kultur und der Rate an Chromosomenanordnungsstörungen [25].

Besondere Bedeutung könnte also dem Zeitpunkt des versuchten Spindelnachweises zukommen. Cohen et al. [39] bemerkten, daß, unabhängig vom Stimulationsprotokoll, eine verbesserte Nachweisbarkeit des Spindelapparates 38–39 Stunden nach Auslösen der Ovulation (81,5 %) gegeben ist, verglichen mit jüngeren Eizellen (61,6 %), die 36–37 Stunden nach hCG-Gabe untersucht wurden. Dies deckt sich mit den Daten von Rienzi und Kollegen [33], die MI-Gameten für 3 Stunden nachreifen ließen und ebenfalls nur in etwa der Hälfte aller Fälle (53,8 %) das Polscope erfolgreich zum Nachweis verwenden konnten.

Längeres *In vitro*-Altern der Gameten führt in den meisten Fällen zu degenerativen Veränderungen der Spindel. Im Detail kommt es zu einer extremen Verkürzung der Spindel [7, 49, 50]. So zeigten Wang et al. [7] eine mittlere Abnahme der Spindellänge von $28,0 \pm 15,3 \mu\text{m}$ auf $8,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$, wenn die Spindel 16–18 Stunden nach ICSI begutachtet wurde. Zusätzlich steigt die Wahrscheinlichkeit, daß es zu einer willkürlichen Anordnung des Chromosomenmaterials kommt [7, 50–52].

In Fällen einer notwendig gewordenen „Rescue-ICSI“ am Tag nach der Eizellgewinnung, etwa bei frustaner IVF am Vortag oder spontaner Nachreifung der GV- und MI-Oozyten, würde sich demnach das Polscope hervorragend eignen, um die spindelintakten *in vitro* maturierten Eizellen für eine intrazytoplasmatische Injektion am Tag 1 auszuwählen [7].

Einfluß der Kryokonservierung auf die meiotische Spindel

Angesichts der weiter oben besprochenen Sensitivität der Teilungsspindel gegenüber Temperaturniedrigungen kommt dem Einfrierprozeß weiblicher Gameten besondere Bedeutung zu.

Eine Arbeit von Zenzes et al. [52] dokumentiert anschaulich den Einfluß von tiefen Temperaturen (0 °C) auf die Spindelstruktur. Es zeigte sich ein sukzessiver Verfall der meiotischen Spindel. Waren die degenerativen Veränderungen zu Beginn (1 Minute bei 0 °C) noch vernachlässigbar, so zeigte sich alsbald (2–3 Minuten bei 0 °C) eine deutliche Verkürzung des Spindelapparates sowie ein merklicher Verlust der Polarität. Die sich weiter fortsetzende Depolymerisierung der Spindel gipfelte nach 10 Minuten im Verschwinden derselben. Bemerkenswerterweise fanden sich die Chromosomen jedoch unverstreut in disorganisierten Clustern.

Leider verabsäumten es diese Autoren [52] zu versuchen, die Eizellen wieder auf die Ausgangstemperatur zu erwärmen, um so das Potential der Mikrotubuli zur Repolymerisierung abzuschätzen. Solche Daten existieren allerdings von Primaten. Beim Rhesusaffen reichte schon 1 Minute bei 0 °C für eine totalen Depolymerisation der Tubulinstrukturen, welche durch Wiedererwärmung zwar teilweise wiederhergestellt werden konnten, allerdings zeigte sich die Chromosomenanordnung danach größtenteils gestört [53].

Demzufolge sind, trotz ansprechender Überlebensraten, die Schwangerschaftsraten nach dem Auftauen eingefrorener Oozyten bekannt niedrig [54], wobei mittels ICSI noch eher auf eine Befruchtung bzw. Schwangerschaft zu hoffen ist [55, 56]. Neben einer strukturellen Veränderung der *Zona pellucida* [57] ist wohl hauptsächlich die degenerative Veränderung des Spindelapparates dafür verantwortlich. Möglicherweise führt eine unmittelbar nach dem Auftauen durchgeführte Inkubation (1–2 Stunden) zu besseren Ergebnissen, da so das Zytoskelett die Möglichkeit hätte, sich zu regenerieren [58].

Verschiedene Autoren zeigten, daß das Zusetzen von Kryoprotektiva alleine die Spindel nicht nachhaltig schädigt [59–61]. Rienzi et al. [61] vermuteten, daß die kritische Phase erst nach dem Auftauprozess beginnt, denn von allen Oozyten, die vor und während des Einfrierprozesses definitiv eine Spindel aufwiesen, zeigten unmittelbar nach dem raschen Auftauen nur mehr 35,7 % eine Spindel und während der anschließenden Waschschritte verschwanden auch diese. Letztendlich kann sich die Spindel in den meisten aufgetauten Eizellen *de novo* repolymerisieren [61, 62], inwieweit auch die Funktion gewährleistet bleibt, sei dahingestellt. Es bleibt natürlich zu diskutieren, ob das angewandte „slow freezing“-Protokoll [61] die Spindel nicht zu lange niedrigen Temperaturen aussetzt und ob nicht die in Sekundenbruchteilen stattfindende Vitrifikation von reifen Eizellen die schonendere Variante wäre, wobei natürlich der Spindelmorphologie vor dem Einfrieren besondere Bedeutung zukommt [63–65].

Spindelanomalien und Chromosomenverteilung

Da sowohl die ICSI-Prozedur *per se* als auch andere Faktoren, die Einfluß auf das Polymerisationsverhalten der Mikrotubuli haben (z. B. suboptimale Kulturbedingungen, Alter, suboptimale Follikulogenese), die Spindelintegrität beeinträchtigen, kann man annehmen, daß auch die entsprechende Spindelfunktion nicht gewährleistet ist. Und obwohl es eine Kontrolle der Spindelfunktion in Säugergameten gibt [66], scheint diese in beeinträchtigten oder älteren Keimzellen relativ permissiv zu sein [67, 68], was zu Fehlverteilungen von Chromosomen führen könnte.

War ein direkter Einfluß der Spindelmorphologie auf die chromosomale Konstitution der Gameten von der *In vitro*-Maturation [25] und der Kryokonservierung von Eizellen her [60] schon bekannt, wurde kürzlich eine Arbeit publiziert [69], die die Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte analysierte. Einmal mehr zeigte sich dabei das Polscope als besonders wertvoll, konnten doch unauffällige Eizellen identifiziert werden. Insgesamt konnten 71 % aller spindelpositiven Gameten chromosomal als in Ordnung befunden werden, während die Zellen ohne nachweisbare Spindel alle mehr oder weniger starke Abweichungen in der Chromosomenanordnung zeigten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der im Labor tätige Embryologe dringendst darauf achten sollte, die meiotische Spindel nicht zu sehr zu strapazieren, um jedwede zusätzliche Beeinträchtigung ihrer Funktion zu vermeiden. Unabdingbar scheint hierbei die konstante Beibehaltung der erforderlichen Temperatur von 37 °C zu sein, welche durch die Verwendung von Heizplatten, be-

heizten Objektischen, sowie durch möglichst kurze Zeiten außerhalb des Brutschrankes gewährleistet wird. Um mechanischen Schäden der Spindel vorzubeugen, garantiert allein das Polarisationsmikroskop inklusive Spindelnachweis zufriedenstellende Ergebnisse.

Danksagung

Besonderer Dank gebührt L. Rienzi, European Hospital, Centre for Reproductive Medicine, Rom, und P. Gaßner, Fa. MTG, Altdorf, sowie dessen Kollegen vom Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie, Abteilung Reproduktionsmedizin und Humangenetik, Regensburg, für das Überlassen der Polscopeabbildungen.

Literatur:

- Compton DA. Spindle assembly in animal cells. *Ann Rev Biochem* 2000; 69: 95–114.
- Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 1999; 96: 79–88.
- Hunter AW, Wordeman L. How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci* 2000; 113: 4379–89.
- Kellogg DR, Moritz M, Alberts BM. The centrosome and cellular organization. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 639–74.
- Maro B, Howlett SK, Webb M. Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase-II-arrested mouse oocytes. *J Cell Biol* 1985; 101: 1665–72.
- Battaglia DG, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996; 11: 2217–22.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 348–53.
- 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: 1464–8.
- Konc J, Kanyó K, Cseh S. Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with polscope. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 349–53.
- Battaglia DE, Klein NA, Soules MR. Changes in centrosomal domains during meiotic maturation in the human oocyte. *Mol Hum Reprod* 1996; 845–51.
- Eichenlaub-Ritter U, Boll I. Nocodazol sensitivity, age related aneuploidy, and alterations in the cell cycle during maturation of mouse oocytes. *Cytogen Cell Genet* 1989; 52: 170–6.
- Eichlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online* 2002; 6: 61–8.
- Van Blerkom J, Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 2001; 16: 757–64.
- Generoso WM, Katoh M, Cain KT, Hughes LA, Foxworth LB, Mitchell TJ, Bishop JB. Chromosome malsegregation and embryonic lethality induced by treatment of normally ovulated mouse oocytes with nocodazole. *Mutat Res* 1989; 210: 313–22.
- Zenzes MT, Wang P, Casper RF. Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 1995; 10: 213–17.
- Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT. Tubulin as a target for anti-cancer drugs: agents which interact with the meiotic spindle. *Med Res Revs* 1998; 18: 259–96.
- Moor RM, Crosby IM. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *J Reprod Fertil* 1985; 75: 467–73.
- Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1987; 2: 207–16.
- Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994; 50: 103–10.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990; 54: 102–8.
- Almeida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995; 3: 357–65.
- Sun XF, Wang WH, Keefe DL. Overheating is detrimental to meiotic spindles within in vitro matured human oocytes. *Zygote* 2004; 12: 65–70.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod* 2001c; 16: 2374–8.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2002; 77: 1274–7.
- Hu Y, Betzendahl I, Cortvrint R, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod* 2001; 16: 737–48.
- Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum Reprod* 2004; 19: 1148–54.
- Palermo G, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril* 1995; 63: 1231–40.
- Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril* 2000; 73: 31–7.
- Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, Martinovich C, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Fanton J, Jacob D, Monteith D, Neuringer M, Battaglia D, Simerly C, Schatten G. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nat Med* 1999; 5: 431–3.
- Silva CP, Kommineni K, Oldenbourg R, Keefe DL. The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. *Fertil Steril* 1999; 71: 719–21.
- Hardarson T, Lundin K, Hamberger L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum Reprod* 2000; 15: 1372–6.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Mathews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997; 12: 532–41.
- Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, Tesarik J, Greco E. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18: 289–93.
- Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18: 817–20.
- Oldenbourg R, Mei G. New polarized light microscope with precision universal compensator. *J Microsc* 1995; 180: 140–7.
- Oldenbourg R. A new view on polarization microscopy. *Nature* 1996; 381: 811–2.
- Oldenbourg R. Polarized light microscopy of spindles. In: Rieder C (ed). *Structure, composition and function of the mitotic/meiotic spindle*. Academic Press, New York, 1998.
- Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR, Keefe DL. A reliable noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of human oocytes. *Nature Biotech* 2000; 18: 223–5.
- Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing JB, Amit A, Azem F. Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod* 2004; 19: 649–54.
- Cooke S, Tyler JP, Driscoll GL. Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod* 2003; 18: 2397–405.
- Rijnders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 2869–73.
- Graham J, Han T, Porter R, Levy M, Stillman R, Tucker J. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril* 2000; 74: 495–7.
- Milki AA, Hinckley MD, Gebhardt J, Dasig D, Westphal LM, Behr B. Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryo. *Fertil Steril* 2002; 77: 1191–5.
- Cortvrint R, Smits J, Van Steirteghem AC. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 11: 2656–66.
- Smits J, Cortvrint R, Van Steirteghem AC. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 466–75.
- Cekleniak NA, Combelles CMH, Ganz DA, Fung J, Albertini DF, Racowsky C. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 1185–93.
- Eppig JJ, Schroeder AC, O'Brien MJ. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 119–27.

48. Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol Reprod* 1995; 52: 1234–43.
49. Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR. Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod* 1988; 3: 978–89.
50. Eichenlaub-Ritter U, Stahl A, Luciani JM. The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged in vitro. *Hum Genet* 1988; 80: 259–64.
51. Kim NH, Moon SJ, Prather RS, Day BN. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 513–8.
52. Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effect of chilling to 0 °C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 769–77.
53. Songsasen N, Yu JJ, Ratterree MS, VandeVoort CA, Leibo SP. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. *Fertil Steril* 2002; 77: 818–25.
54. Ludwig M, Al-Hasani S, Felberbaum R, Diedrich K. New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives. *Hum Reprod* 1999; 14 (Suppl 1): 162–85.
55. Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, Laing MA, Hamilton MP, Templeton A. Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 2650–4.
56. Würfel W, Schleyer M, Krusmann G, Hertwig IV, Fiedler K. Fertilization of cryopreserved and thawed human oocytes (Cryo-Oo) by injection of spermatozoa (ICSI)—medical management of sterility and case report of a twin pregnancy. *Zentralbl Gynakol* 1999; 121: 444–8.
57. Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol Reprod* 1989; 40: 179–83.
58. Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 1998; 69: 944–57.
59. Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 354–60.
60. Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002; 17: 1885–91.
61. Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004; 19: 655–9.
62. Stachecki J. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 664–72.
63. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod* 2001; 16: 2350–6.
64. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449–54.
65. Chen CK, Wang CW, Tsai WJ, Hsieh LL, Wang HS, Soong YK. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy. *Fertil Steril* 2004; 82: 666–72.
66. Brunet S, Pahlavan G, Taylor S, Maro B. Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction* 2003; 126: 443–50.
67. Steuerwald N, Cohen J, Herrera LJ, Sandalinas M, Brenner CA. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 49–55.
68. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 45–58.
69. Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertil Steril* 2002; 78: 1077–81.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

Impressum

Disclaimers & Copyright

Datenschutzerklärung