

## APŽVALGINIS STRAIPSNIS

### Oocitų kokybės morfologiniai požymiai

Kristina Lasienė, Aleksandras Vitkus, Angelija Valančiūtė, Vidmantas Lasys<sup>1</sup>

Kauno medicinos universiteto Histologijos ir embriologijos katedra,

<sup>1</sup>Lietuvos veterinarijos akademijos Anatomijos ir fiziologijos katedra

**Raktažodžiai:** oocitai, kokybė, morfologiniai požymiai.

**Santrauka.** Pagalbinio apvaisinimo technologija apima oocitų atrinkimą, jų apvaisinimą *in vitro*, embrionų auginimą bei jų transplantaciją į gimdą. Nuo oocitų kokybės tiesiogiai priklauso jų apvaisinimo ir tolesnio embrionų auginimo *in vitro* sėkmė. Apie oocito tinkamumą tolesnėms procedūroms sprendžiama pagal jo požymius, kurie skirstomi į morfologinius, ląstelinius bei molekulinus. Šiame straipsnyje siekiame apžvelgti morfologinius kriterijus, kurie galėtų būti taikomi oocitų kokybei įvertinti prieš atliekant jų apvaisinimą *in vitro* – tai oocito – spindulinio vainiko komplekso struktūros, oocito citoplazmos, polocito, perivitelinio tarpo, skaidriosios zonos ir mejozinės verpstės įvertinimas.

#### Įvadas

Žmogaus ir gyvūnų reprodukcinės technologijos (nuo oocitų brandinimo ir apvaisinimo *in vitro* iki gyvūnų klonavimo) ypač intensyviai tobulinamos pastaraisiais dešimtmečiais. Pagrindinis objektas, naudojamas šių technologijų procedūroms, yra oocitai. Oocitų kokybė turi didžiausią įtaką monosperminiam apvaisinimui, ankstyvajam embrionų formavimuisi bei implantacijai. Todėl oocitų kokybės įvertinimas gali būti lemiamas veiksnys apvaisinimui, kokybiškiems embrionams auginti ir nevaisingumui gydyti. Šio straipsnio tikslas – apžvelgti morfologinius požymius, nulemiančius oocitų kokybę.

#### Mejozinis oocito dalijimasis (subrendimas)

Oocito subrendimas apima du tarpusavyje susijusius procesus – branduolio ir citoplazmos subrendimą. Žinduolių oocitai randami kiaušidės folikuluose mejozės I profazės diplotenos stadijoje. Veikiant dideliame adenohipofizėje išskiriamo liuteinizuojančio hormono (LH) kiekiui organizme (*in vivo*), oocitai atnaujina mejozinį dalijimąsi – persitvarko oocito branduolys. Išnyksta oocito branduolio apvalkalas (1). Centriolių mikrovamzdeliai ima persitvarkyti į mejozinę (dalijimosi) verpstę ir visos chromosomos išsidėsto ląstelės centre. Oocite tęsiasi pirmasis mejozinis dalijimasis, kuriam pasibaigus atsiskiria pirmasis polocitas ir jis patenka į perivitelinį tarpą. Prasideda II mejozinis dalijimasis, kuris sustoja metafazėje II. Šis procesas

vadinamas oocito branduolio subrendimu (2).

Kad oocitas būtų sėkmingai apvaisintas ir vystytųsi naujas organizmas, tuo pat metu turi būti subrendęs ne tik oocito branduolys, bet ir citoplazma (2, 3). Esant nesubrendusiai oocito citoplazmai, pasisėkus apvaisinimui, embrionas negali normaliai vystytis (4). Kol kas žinomas tik vienintelis būdas, kuriuo galima nustatyti, ar oocito citoplazma subrendusi – tai oocito apvaisinimo ir embriono vystymosi *in vitro* stebėsena (3). Todėl įvairių aplinkos veiksnių ir brandinimo terpių įtaka oocitų branduolio ir citoplazmos subrendimui *in vitro* vertinama tik pagal apvaisintų oocitų ir besivystančių embrionų skaičių.

#### Oocito kokybės įtaka embriono vystymuisi

M. A. Sirard su kolegomis (5) nurodė oocito kokybės įtaką besitęsiančiai mejozei, zigotos skilimui, embriono vystymuisi iki blastocistos stadijos, jo implantacijai į gimdą ir sveiko palikuonio gimimui. Citoplazmos pokyčiai, atsirandantys oocito augimo laikotarpiu, apima informacinės RNR transkripciją ir baltymų sintezę (6, 7). Šie procesai būtini oocitui subręsti, zigotos genomui aktyvinti ir blastocistai formuotis (8, 9). Oocitas yra sudėtingos struktūros ląstelė, turinti daugybę organelių, kurių kiekviena turi būti atitinkamos būsenos, kad ląstelė galėtų bręsti (10). Bet kokie oocito komponentų (mejozinės verpstės, citoplazmos grūdelių ar mitochondrijų) funkcijos ir lokalizacijos pokyčiai mažina oocito gyvybingumą, o po apvaisi-

**Lentelė. Oocito kokybę rodantys požymiai (14)**

Požymiai	Parametrai	Autoriai
Oocito – spindulinio vainiko kompleksas	Spindulinio vainiko storis ir kompaktiškumas, oocito citoplazmos ryškumas	Blondin ir Sirard 1995; Warriach ir Chohan 2004; Nagano ir kt., 2006
Oocito citoplazma	Grūdėtumas, spalvos vienodumas, organelių išsidėstymas grupelėmis	Serhal ir kt., 1997; Balaban ir kt., 1998; Kahraman ir kt., 2000
Polocitas	Forma (apvali arba ovali), dydis (didelis arba mažas), paviršius (lygus arba grublėtas), citoplazma (fragmentuota arba tolygi)	Ebner ir kt., 2000; Ciotti ir kt., 2004
Skaidrioji zona	Storis, struktūra	Gabrielsen ir kt., 2001
Perivitelinis tarpas	Dydis (normalus ar padidėjęs), grūdelių yra ar jų nėra	De Sutter ir kt., 1996; Hassan-Ali ir kt., 1998
Mejozinė verpstė	Išsidėstymo vieta	Wang ir kt., 2001; Moon ir kt., 2003; Rienzi ir kt., 2003

nimo turi lemiamos įtakos embriono formavimuisi ir jo visavertiškumui (11–13). Oocito kokybės svarba embriono vystymuisi paskatino mokslininkus intensyviai ieškoti patikimų jos įvertinimo požymių, kurie buvo suskirstyti į morfologinius, ląstelinius ir molekulinis. Šiame straipsnyje apžvelgiame morfologinius požymius, kurie taikomi oocitų kokybei nustatyti (lentelė).

**Oocitų kokybės morfologiniai požymiai**

Prieš atliekant apvaisinimo *in vitro* procedūrą, oocitų kokybė dažniausiai vertinama pagal oocito – spindulinio vainiko komplekso struktūrą. Šis įvertinimas yra nesudėtingas ir suteikia informacijos apie oocito kokybę. Tiksliau oocito kokybę nustatyti galima kartu įvertinant oocito – spindulinio vainiko komplekso struktūros, oocito citoplazmos, polocito, perivitelinio tarpo, skaidriosios zonos ir mejozinės verpstės savybes (14).

**Oocito – spindulinio vainiko kompleksas**

Oocito – spindulinio vainiko kompleksai, paimti iš kiaušidės folikulų, klasifikuojami atsižvelgiant į oocitą supančio spindulinio vainiko kompaktiškumą bei oocito citoplazmos savybes. Pavyzdžiui, galvijų oocito – spindulinio vainiko kompleksai grupuojami į tris kokybės kategorijas. A kategorijos oocito – spindulinio vainiko komplekse oocitą supa kompaktiškas spindulinis vainikas, sudarytas iš ne mažiau kaip penkių ląstelių sluoksnių, oocito citoplazma – beveik permatoma, homogeniška arba matomas tamsus žiedas periferijoje. B kategorijos komplekse – spindulinis

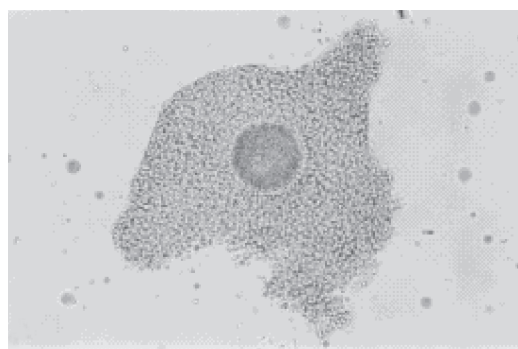
vainikas ne toks kompaktiškas, oocito citoplazma: tamsi, nežymiai grūdėta. C kategorijos – spindulinio vainiko ląstelės išsisklaidžiusios, oocito citoplazma – tamsi, grūdėta (15, 16) (1 pav.). Teigiama, kad iš B kategorijos oocito – spindulinio vainiko kompleksuose esančių oocitų, apvaisinus juos *in vitro*, vystosi daugiau embrionų nei iš A ir C ( $B > A > C$ ) (17–19), tačiau šio fenomeno priežastys dar nepakankamai ištirtos.

Spindulinio vainiko ląstelių sluoksnių skaičius yra reikšmingas veiksnys nustatant oocito kokybę. Teigiama, kad kuo daugiau ląstelių sluoksnių supa oocitą, tuo geresnė jo kokybė (15, 20–22). Apie moters oocito – spindulinio vainiko kompleksų grupavimą pagal jų kokybę mums prieinamoje literatūroje duomenų neradome.

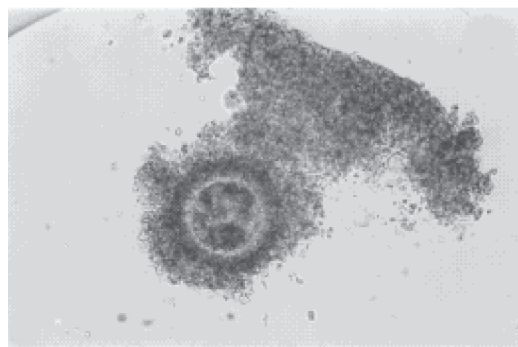
**Oocito citoplazma ir polocitas**

Įvertinus oocito – spindulinio vainiko komplekso kokybę, prieš intracitoplazminę spermatozoido injekciją nuo oocitų pašalinamos spindulinio vainiko ląstelės. Taip atsiranda daugiau galimybių šviesos mikroskopu tiksliau įvertinti oocito sandaros savybes.

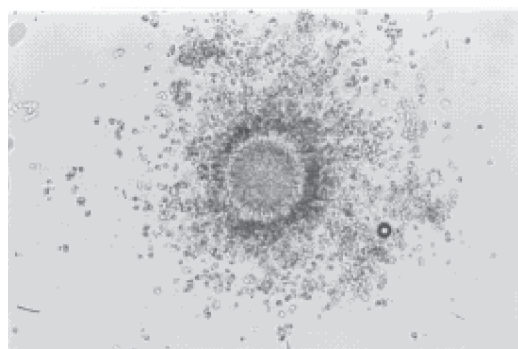
Moters oocito citoplazma klasifikuojama atsižvelgiant į jos spalvą, grūdėtumą (stambūs ar smulkūs grūdėliai; grūdelių pasiskirstymą: homogeniškas ar telkiniais, oocito centre ar periferijoje); perivitelinio tarpo dydį ir organelių (vakuolių, endoplazminio tinklo) išsidėstymą. Atsižvelgiant į šiuos morfologinius požymius, moters oocitai grupuojami į: 1) normalios sandaros; 2) su ekstracitoplazminėmis anomalijomis (tamsi skaidrioji zona, didelis perivitelinis tarpas); 3) su intracitoplazminėmis anomalijomis (tamsi ar



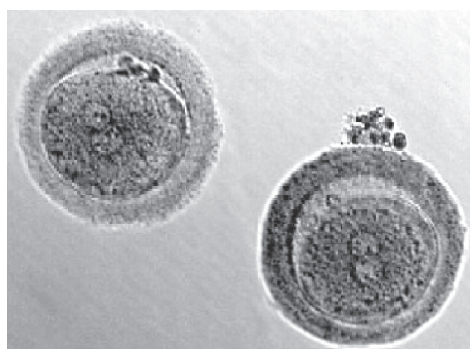
A



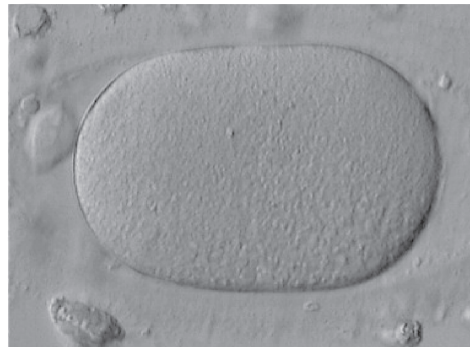
B



C



A



B



C

### 1 pav. Įvairių kategorijų galvijų oocito – spindulinio vainiko kompleksai (17)

A kategorijos oocito – spindulinio vainiko komplekse oocitą supa kompaktiškas spindulinis vainikas, oocito citoplazma – homogeniška; B kategorijos komplekse spindulinis vainikas ne toks kompaktiškas, oocito citoplazma – tamsi, nežymiai grūdėta; C kategorijos komplekse spindulinio vainiko ląstelės išsisklaidžiusios, oocito citoplazma grūdėta.

grūdėta citoplazma, atsiskyrę citoplazmos fragmentai); 4) pakitusios formos oocitus; 5) oocitus su dauginiais pokyčiais (23) (2 pav.). Nustatyta, kad geriausiai gimdoje implantuojasi embrionai, apvaisinti iš normalios sandaros (I grupės) oocitų. Oocitų su pakitusia citoplazma apvaisinama mažiau, o daugelio tokių besivystančių embrionų ląstelėse nustatoma aneuploidija (aneuploidija – chromosomų skaičiaus padidėjimas arba sumažėjimas viena ar keliomis chromosomomis) (23–25, 27).

### 2 pav. Normalios sandaros oocitai ir oocitai su kai kuriais sandaros pokyčiais

A kairėje: normalios sandaros apvaisintas moters oocitas; A dešinėje: apvaisintas oocitas su tamsia skaidriąja zona, dideliu perivitelinio tarpu bei tamsia grūdėta citoplazma (23); B – oocitas su ovalia skaidriąja zona ir citoplazma; C – oocitas su apvalia citoplazma ir ovalia skaidriąja zona (26).

M. Nagano su kolegomis (28) tyrė sąsają tarp galvijų oocitų, gautų iš mažų tretinių folikulų, citoplazmos savybių ir jų vystymosi po apvaisinimo. Jie nustatė, kad tamsią oocito citoplazmos spalvą lemia lipidų sanaujos. Tokie oocitai gerai vystosi po apvaisinimo *in vitro*. Oocituose su šviesia citoplazma jie rado mažai organelių; „senstančių“ oocitų citoplazma tamsėja. Abu šios grupės oocitai vystosi blogai.

Pirmojo polocito sandaros savybės rodo moters oocito „amžių“ po ovuliacijos. Oocitui „senstant“, pir-



mojo polocito kūnelis degeneruoja (29). Tam tikri polocito požymiai: forma (apvali arba ovali), dydis (didelis arba mažas), paviršius (lygus arba grublėtas), citoplazmos vientisumas (vientisa arba fragmentuota) – gali būti naudojami oocito kokybei įvertinti (30, 31). Apvaisinti oocitai su fragmentuotu pirmuoju polocitu vystėsi blogiau (55,1 proc.) nei su normalios sandaros polocitu (60,3 proc.) (24).

#### Perivitelinis tarpas ir skaidrioji zona

Perivitelinis tarpas moters oocituose gali skirtis dydžiu (padidėjęs arba ne) ir grūdėtumu (grūdelių yra arba ne) (24, 32). Nustatyta, kad oocitai su padidėjusiu periviteliniu tarpu po apvaisinimo vystosi blogiau (37,5 proc.) nei su normaliu (60,3 proc.) (24). Oocitų, kurių periviteliniame tarpe buvo stambių grūdelių, po apvaisinimo vystėsi mažiau (59 proc.) nei tų, kurių šiame tarpe grūdelių nepastebėta (71,1 proc.) (32).

Moters oocitų skaidrioji zona (*zona pellucida*) skiriasi savo storiu (10–31  $\mu\text{m}$ ). Per storą skaidriąją zoną spermatozoidai prasiskverbia sunkiai. *In vitro* geriausiai apvaisinami ovocitai, kurių skaidriosios zonos storis neviršija 18,6  $\mu\text{m}$ . Jeigu ji storesnė nei 22  $\mu\text{m}$ , nevaisingoms moterims rekomenduojama transplanotuoti embrionus, išaugintus atlikus intracitoplazminę spermatozoido injekciją į oocitą (33). Skaidriosios zonos storis embrionų vystymuisi po intracitoplazminės spermatozoido injekcijos įtakos neturi (34).

#### Mejozinė verpstė

Nuo mejozinės verpstės priklauso taisyklingas chromosomų išsidėstymas oocite ir jų išsiskyrimas mejozės metu. Verpstės parametrai (refrakcija, išsidėstymo vieta) dažnai vartojami oocito kokybei nustatyti. Mejozinė verpstė išryškinama tiriant konfoka-

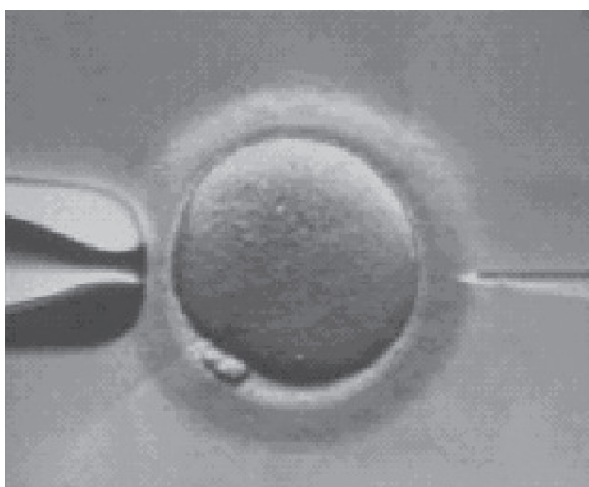
liniu mikroskopu, oocitą fiksavus ir nudažius tam tikrais fluorescuojamaisiais dažais, dėl to oocitai žūva. Todėl anksčiau, siekiant išvengti verpstės ir chromosomų pažeidimo intracitoplazminės spermatozoido injekcijos metu, adata būdavo durinama į oocito citoplazmą, atsižvelgiant į pirmojo polocito buvimo vietą. Tačiau oocituose pirmojo polocito buvimo vieta nėra tikslus žymuo, rodantis, kur yra mejozinė verpstė (35–37).

Šiuo metu mejozinė verpstė gali būti apžiūrima ir jos vieta nustatoma poliarizaciniu mikroskopu nepažeidžiant oocito. Tam dažniausiai naudojamas „Polscope“ mikroskopas (Cambridge, MA, JAV) (3 pav.). Juo nustatyta, kad oocitai su dviguba spindulių refrakcija pasižymi mejozės verpste, apvaisinti *in vitro*, vystosi geriau (37, 39, 40–42).

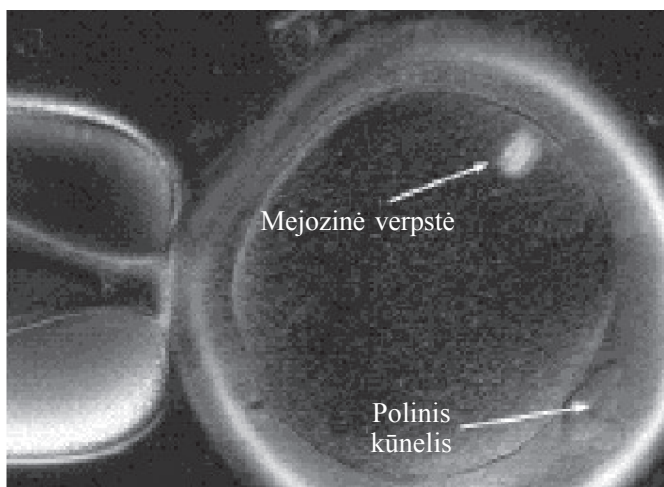
J. H. Moon su kolegomis (2003), „Polscope“ mikroskopu nustatė, kad mejozinės verpstės padėtis ovocite gali būti įvairi (4 pav.). Todėl „aklai“ atliekant intracitoplazminę spermatozoido injekciją į ovocitą, ją galima pažeisti. Tačiau priklausomybės tarp mejozinės verpstės nuokrypio nuo polocito ir ovocitų apvaisinimo rezultatų nėra (37, 40, 44).

D. E. Battaglia ir kt. (43) teigia, kad oocitų su verpstės sandaros anomalijomis (netaisyklingas baltymo tobulino išsidėstymas) daugėja priklausomai nuo moters amžiaus (40 metų ir vyresnių). Tai lemia vienos ar kelių chromosomų išstūmimą iš metafazinės plokštelės antrojo mejozinio dalijimosi metu – tai kas sukelia aneuploidiją embrionų ląstelėse.

Teigiama, kad „senstančiuose“ moters oocituose mejozinė verpstė suyra (37). Tiksliai oocito sandaros analizė, kartu išryškinant mejozinę verpstę poliarizaciniu mikroskopu, gali būti informatyvus neinvazinis oocito kokybės ir tolesnio embriono formavimosi įvertinimo veiksnys.

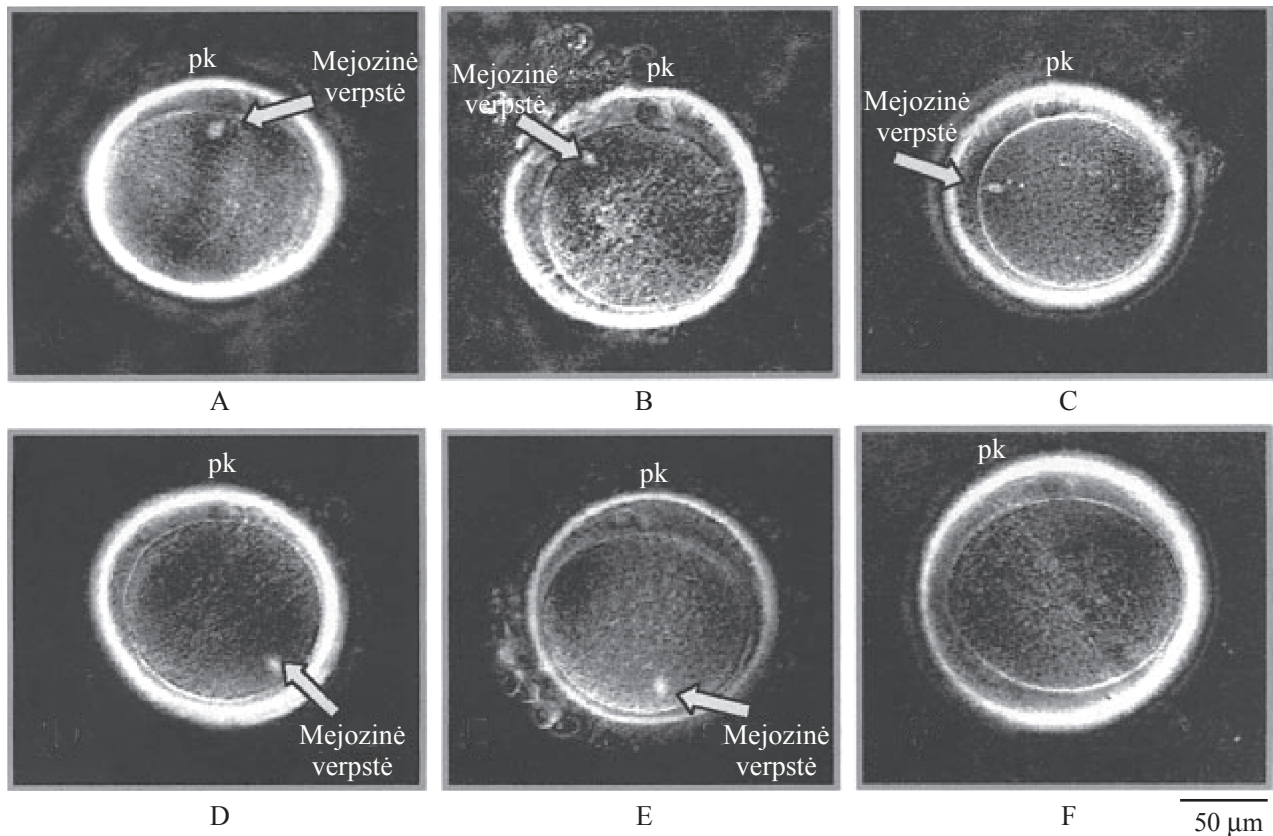


A



B

3 pav. Moters oocito mejozinė verpstė ir polocitas stebint šviesiniu (A) ir poliarizaciniu „Polscope“ (B) mikroskopais (39)



**4 pav. Įvairi mejozinės verpstės padėtis moters oocituose (40)**

A – mejozinė verpstė, išsidėsčiusi po poliniu kūneliu; B – mejozinė verpstė, išsidėsčiusi 0–60° kampu nuo polinio kūnelio; C – mejozinė verpstė, išsidėsčiusi 60–120° kampu nuo polinio kūnelio; D – mejozinė verpstė, išsidėsčiusi 120–180° kampu nuo polinio kūnelio; E – mejozinė verpstė, išsidėsčiusi didesniu nei 120° kampu nuo polinio kūnelio; F – mejozinė verpstė nepastebima; pk – polinis kūnelis.

### Išvada

Prieš atliekant bet kokiais manipuliacijoms su oocitais, prieš apvaisinant būtina kiek galima tiksliau įvertinti jų visavertiškumą, nes nuo to priklauso embrionų formavimasis. Tiksliausiai oocito tinkamumą apvai-

sinti galima nustatyti tik kartu įvertinus oocito – spindulinio vainiko komplekso struktūros, oocito citoplazmos, polocito, perivitelinio tarpo, skaidriosios zonos ir mejozinės verpstės savybes.

### Morphological criteria of oocyte quality

**Kristina Lasienė, Aleksandras Vitkus, Angelija Valančiūtė, Vidmantas Lasys<sup>1</sup>**

*Department of Histology and Embryology, Kaunas University of Medicine,*

*<sup>1</sup>Department of Anatomy and Physiology, Lithuanian Veterinary Academy, Lithuania*

**Key words:** oocytes; quality; morphological criteria.

**Summary.** In vitro fertilization technology consists of the selection and fertilization of oocytes, the production and transplantation of embryos to recipients. The quality of oocytes has a direct impact on the fertilization and developmental competence of oocytes. Criteria that show the quality of oocytes are subdivided into morphological, cellular, and molecular. *The aim of this article* was to review the morphological criteria that are used for estimation of the quality of oocytes before their fertilization in vitro. These criteria include

the evaluation of the structure of oocyte: cumulus complex, oocyte cytoplasm, polar body, perivitelline space, zona pellucida, and meiotic spindle.

Correspondence to K. Lasienė, Department of Histology and Embryology, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus, 44307 Kaunas, Lithuania. E-mail: krislasi@itc.kmu.lt

## Literatūra

1. Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2004;70:535-47.
2. Sun QY, Nagai T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev* 2003;49:347-59.
3. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004;82:E14-23.
4. Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 2003;60:923-32.
5. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006;65:126-36.
6. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1989;40:1257-63.
7. Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruip TA. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol Reprod Dev* 1991;29:271-5.
8. Barnes FL, First NL. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1991;29:117-23.
9. De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME, Watson AJ. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology* 1998;49:115-28.
10. Trimarchi JR, Keefe DL. Assessing the quality of oocytes derived from in vitro maturation: are we looking under the lamp post? *Fertil Steril* 2006;85:839-40.
11. Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 2001;122:155-63.
12. Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann NY Acad Sci* 2004;1034:132-44.
13. Combelles CM, Racowsky C. Assessment and optimization of oocyte quality during assisted reproductive technology treatment. *Semin Reprod Med* 2005;23:277-84.
14. Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:1-12.
15. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995;41:54-62.
16. Mayes MA, Sirard MA. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology* 2001;55:911-22.
17. De Wit AA, Wurth YA, Kruip TA. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci* 2000;78:1277-83.
18. De Wit AA, Kruip TA. Bovine cumulus-oocyte-complex quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Anim Reprod Sci* 2001;65:51-65.
19. Boni R, Cuomo A, Tosti E. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol Reprod* 2002;66:836-42.
20. Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, Jewgenow K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 2003;59:1421-33.
21. Warriach HM, Chohan KR. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. *J Vet Sci* 2004;5:247-51.
22. Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JL, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, et al. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 2005;63:2147-63.
23. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13(12):3431-3.
24. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997;12:1750-5.
25. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:2390-3.
26. Ebner T, Shebl O, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Developmental fate of ovoid oocytes. *Hum Reprod* 2007;22(12):3077-82.
27. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:1267-70.
28. Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote* 2006;14:53-61.
29. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 1995;10:2343-9.
30. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:427-30.
31. Ebner T, Moser M, Sommergruber C, Yaman C, Pfleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 2002;17:2415-8.
32. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:3425-30.

33. Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y. Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? Hum Reprod 1995; 10(5):1189-93.
34. Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen, K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. Hum Reprod 2001;16:2166-70.
35. 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.
36. Silva CP, Kommineni K, Oldenbourg R, Keefe DL. The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase 2 meiotic spindle in mammalian oocytes. Fertil Steril 1999;71:719-21.
37. 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.
38. Fletcher-Holmes DW, Boutin C, Hoyt C. Assessing oocyte quality using birefringence imaging. Oosight™ imaging system. 2002. Available from: URL: <http://www.cri-inc.com/files/Oosight%20WP%20Assessing%20Oocyte%20Qual%20w%20Biref%20Img%2002.pdf>
39. 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.
40. 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.
41. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, De Santis L, Cino I, Tinneberg HR, et al. Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI. Reprod Biomed Online 2006;12(6):737-51.
42. Fang C, Tang M, Li T, Peng WL, Zhou CQ, Zhuang GL, et al. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes. J Assist Reprod Genet 2007;24(11):495-9.
43. Battaglia DE, 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.
44. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. Hum Reprod 2003;18:1289-93.

*Straipsnis gautas 2007 11 23, priimtas 2009 07 03*

*Received 23 November 2007, accepted 3 July 2009*