

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nina FEKONJA

**IZVOR VAKUOL V GLAVI ČLOVEŠKIH
SPERMIJEV IN NJIHOV POMEN V HUMANI
REPRODUKCIJI**

Magistrsko delo

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nina FEKONJA

**IZVOR VAKUOL V GLAVI ČLOVEŠKIH SPERMIJEV IN NJIHOV
POMEN V HUMANI REPRODUKCIJI**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2. Stopnja)

**ORIGIN OF HUMAN SPERM HEAD VACUOLES AND THEIR
IMPORTANCE IN HUMAN REPRODUCTION**

M. Sc. THESIS
(Master Study Programmes)

LJUBLJANA, 2014

Magistrsko delo je nastalo v okviru magistrskega študija strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za oploditev z biomedicinsko pomočjo na Ginekološki kliniki, Univerzitetni klinični center ter v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

Študijska komisija podiplomskega študija Strukturne in funkcionalne biologije je na seji, dne 8. 3. 2013 odobrila naslov magistrskega dela. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Irma Virant Klun, za somentorico prof. dr. Jasna Štrus in za recenzentko prof. dr. Eda Vrtačnik Bokal.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Lilijana BIZJAK MALI
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Irma VIRANT KLUN
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika, Oddelek za reprodukcijo

Članica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka prof.dr. Eda VRTAČNIK BOKAL
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika, Klinični oddelek za reprodukcijo

Datum zagovora: 11. 7. 2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Nina FEKONJA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK UDK 575:618.177-089.888.11(043.2) = 163.6
KG Spermiji/vakuole/TEM/reprodukcia človeka
AV FEKONJA, Nina, diplomirana biologinja
SA VIRANT-KLUN, Irma (mentor)/ŠTRUS, Jasna (somentor)
KZ SI-1000 LJUBLJANA, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2014
IN IZVOR VAKUOL V GLAVI ČLOVEŠKIH SPERMIJEV IN NJIHOV POMEN V HUMANI REPRODUKCIJI
TD Magistsko delo (magistrski študij – 2.stopnja)
OP XIII, 46, 5 pregl., 12 sl., 35 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Pomen vakuol v glavi človeških spermijev je še vedno slabo razumljiv, zato smo v magistrski nalogi že leli bolje pojasniti klinične in ultrastastrukturne značilnosti vakuol v glavah spermijev moških, vključenih v program zunajtelesne oploditve. S svetlobnim mikroskopom smo pri povečavi nad 6000X (metoda MSOME) pregledali 40 normalnih (normozoospermija) in 41 nenormalnih (teratozoospermija) vzorcev semena in jih ocenili glede na prisotnost vakuol v glavah spermijev. Rezultate smo primerjali z izidom zunajtelesne oploditve, z moškimi dejavniki in kakovostjo semena. Statistična analiza podatkov je pokazala, da je nenormalno seme (teratozoospermija) vsebovalo večji delež vakuol v glavi spermijev v primerjavi z normalnim semenom in da se velike vakuole pogosteje pojavljajo v semenu s slabšo kakovostjo (koncentracijo, gibljivostjo, morfologijo spermijev). Kljub temu smo ugotovili, da vakuole v glavah spermijev niso odvisne od moških dejavnikov kot so starost, višina, teža, indeks telesne mase (ITM), kajenje. Delež oplojenih jajčnih celic je bil manjši po metodi klasične zunajtelesne oploditve (IVF), kjer so v semenu prisotne tudi velike vakuole medtem, ko nismo pa opazili povezav z uspešnostjo zanositve. Del vzorcev semena oziroma spermije smo fiksirali in s pomočjo presevn elektronske mikroskopije opisali ultrastrukturne značilnosti vakuol v glavah spermijev. Ugotovili smo, da so vakuole jedrne ugreznitve različnih velikosti, zapolnjene z membranami, ki so urejene v membranske svitke.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDK 575:618.177-089.888.11(043.2) = 163.6
CX Spermatozoa/vacuoles/TEM/human reproduction
AU FEKONJA, Nina
AA VIRANT-KLUN, Irma (supervisor)/ŠTRUS, Jasna (co-supervisor)
PP SI-1000 LJUBLJANA, Večna pot 111
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
PY 2014
TI ORIGIN OF HUMAN SPERM HEAD VACUOLES AND THEIR IMPORTANCE
IN HUMAN REPRODUCTION
DT M. Sc. Thesis
NO XIII, 46, 5 tab., 12 fig., 35 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB The human sperm head vacuoles and their potential role in male infertility is still poorly understood. The aim of this study was to identify the clinical and ultrastructural features of human sperm head vacuoles in men included in the in vitro fertilization programme: men with normal (normozoospermia) and impaired sperm morphology (teratozoospermia). The sperm samples were observed at 6000-times magnification to evaluate the sperm head vacuoles using motile sperm organelle morphology examination (MSOME). In this way, the proportion of sperm with head vacuoles was evaluated and related to the outcome of in vitro fertilization. The sperm of men with impaired sperm morphology (teratozoospermia) was characterized by a higher proportion of sperm head vacuoles than in normospermic men, therefore this may be related to pathological state. The sperm head vacuoles were related to impaired semen quality (sperm concentration, motility, morphology) but were not influenced by male factors such as age, height, weight or body mass index. Moreover, sperm head vacuoles were related to impaired fertilization rate after classical in vitro fertilization (IVF) but not after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), while there was no relation with pregnancy. In a subgroup of men the sperm was fixed and observed by transmission electron microscopy (TEM) to study the sperm head vacuoles. The ultrastructural study revealed that sperm head vacuoles are large nuclear indentations of various sizes and positions, packed with membranous material organized in membrane whorls (MW).

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VII |
| KAZALO SLIK | VIII |
| SLOVARČEK | XI |
| | |
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1. SPERMIJ IN SEME | 3 |
| 2.1.1. Spermiogeneza | 3 |
| 2.1.2. Morfologija spermija | 4 |
| 2.1.3. Vakuole v glavi spermijev | 5 |
| 2.2. NEPLODNOST IN ZUNAJTELESNA OPLODITEV | 7 |
| 2.2.1. Moška neplodnost | 7 |
| 2.2.2. Zunajtelesna oploditev | 9 |
| 2.2.3. Vpliv vakuol v glavah spermijev na izid zunajtelesne oploditve | 10 |
| 2.3. NAMEN DELA | 10 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 13 |
| 3.1. MATERIALI | 13 |
| 3.1.1. Biološki material | 13 |
| 3.1.2. Kemikalije | 13 |
| 3.1.3. Oprema | 13 |
| 3.2. METODE | 14 |
| 3.2.1. Razvrščanje spermijev v razrede glede na prisotnost in značilnosti vakuol v glavah s pomočjo metode MSOME | 14 |
| 3.2.1.1. Priprava semenskega vzorca za opazovanje s svetlobnim invertnim mikroskopom | 14 |

| | | |
|---------------|---|----|
| 3.2.1.2. | Opazovanje semena s svetlobnim invertnim mikroskopom pod 6000X povečavo (MSOME) | 15 |
| 3.2.2. | Zunajtelesna oploditev | 16 |
| 3.2.3. | Opazovanje ultrastrukture vakuol spermijev s presevnim elektronskim mikroskopom | 16 |
| 3.2.3.1. | Fiksacija vzorca semena in priprava ultra-tankih rezin | 17 |
| 3.2.3.2. | Opazovanje ultrastrukture spermijev in vakuol s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) | 18 |
| 3.2.4. | Statistična analiza podatkov | 18 |
| 4. | REZULTATI | 19 |
| 4.1. | METODA PREGLEDA MORFOLOGIJE ORGANELOV GIBLJIVEGA SPERMIJA S SVETLOBNIM MIKROSKOPOM (MSOME) | 19 |
| 4.1.1. | Vakuole v glavah spermijev, vidne s svetlobnim mikroskopom | 19 |
| 4.1.2. | Vakuole v glavah spermijev, klasični parametri kakovosti semena in moški dejavniki | 20 |
| 4.1.3. | Vakuole v glavah spermijev in izid postopka zunajtelesne oploditve | 24 |
| 4.2. | PRESEVNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM) | 27 |
| 4.2.1. | Ultrastrukturne značilnosti vakuol v glavah spermijev | 27 |
| 5. | RAZPRAVA | 34 |
| 5.1. | SVETLOBNA MIKROSKOPIJA | 34 |
| 5.1.1. | Opazovanje vakuol z metodo MSOME | 34 |
| 5.1.2. | Pojav vakuol v semenu normalne in nenormalne kakovosti (MSOME), klasični parametri spermiograma in moški dejavniki | 35 |
| 5.1.3. | Vakuole v glavah spermijev in izid postopka zunajtelesne oploditve (IVF, ICSI) | 36 |
| 5.2. | ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA | 36 |
| 5.2.1. | Ultrastrukturne značilnosti vakuol | 37 |
| 6. | SKLEPI | 39 |
| 7. | POVZETEK | 41 |
| 8. | REFERENCE | 43 |

KAZALO PREGLEDNIC

- Pregl. 1:** Primerjava klasičnih parametrov kakovosti semena in vakuol v glavi spermijev glede na kakovost semena (normozoospermija, teratozoospermija) 21
- Pregl. 2:** Povezave med vakuolami v glavah spermijev (deleži spermijev Razredov I, II, III in IV) in klasičnimi parametri spermiograma (koncentracija, gibljivost, morfologija spermijev), *Legenda:* N - število vzorcev semena 22
- Pregl. 3:** Povezava med moškimi dejavniki (višja starost, višina, teža, ITM), klasičnimi parametri spermiograma in vakuolami v glavah spermijev; Spermanov koeficient korelacije, *Legenda:* ITM - indeks telesne mase, N - število vzorcev semena 23
- Pregl. 4:** Izid postopka zunajtelesne oploditve (zanositev) glede na kakovost semena (normozoospermija, teratozoospermija), *Legenda:* IVF - klasična zunajtelesna oploditev; ICSI - neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice 25
- Pregl. 5:** Povezava med deležem "dobrih" spermijev (spermiji Razredov I + II) in "slabih" spermijev (spermiji Razredov III + IV) v vzorcih semena glede na vakuole v glavah spermijev in izidom postopka zunajtelesne oploditve (delež oplojenih jajčnih celic, delež blastocist) glede na metodo zunajtelesne oploditve. *Legenda:* IVF (N) - klasična zunajtelesna oploditev z normalnimi semenskimi vzorci; ICSI (T) - neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice z nenormalnimi semenskimi vzorci; Delež oplojenih jajčnih celic - število oplojenih jajčnih celic na število jajčnih celic; Delež blastocist - število blastocist na število zarodkov, N - število vzorcev semena 26

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Sl. 1: Spermatogeneza ali nastanek moških gamet (prirejeno po spletнем viru: repropedia.org) | 1 |
| Sl. 2: Spermiogeneza ali diferenciacija moških gamet (prirejeno po Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12. izdaja) | 4 |
| Sl. 3: Zgradba zrelega spermija; N jedro (prirejeno po Sathananthan et al., 2013) | 4 |
| Sl. 4: Razvrščanje spermijev v razrede glede na značilnosti vakuol (Vanderzwalm en sod., 2008) | 16 |
| Sl. 5: Vakuole v glavi spermijev v semenu normalne kakovosti (A, C, E) in nenormalne kakovosti (T, poslabšana morfologija spermijev) (B, D, F). Svetlobna mikroskopija (DIC Nomarski), 6000-kratna povečava | 19 |
| Sl. 6: Elektronska mikrografija (TEM) normalnega spermija. <i>Legenda</i> : N - Jedro, A - Akrosom, M - Mitohondriji | 27 |
| Sl. 7: Elektronske mikrografije (TEM) normalnih vzorcev semena z vakuolami v glavah spermijev - različne velikosti in lege vakuol. B, D: apikalno, C: lateralno. <i>Legenda</i> : A - Akrosom, N - Jedro, M - Mitohondriji | 28 |
| Sl. 8: Elektronske mikrografije (TEM) vakuol v glavah spermijev normalnih vzorcev semena (A, C, D, E, F) in nenormalnih vzorcev semena (teratozoospermija) (B). A: Jadrne vdolbine z membranami, ki obdajajo kosmičast material (zvezdica). Dvojne membrane z molekularnimi septami (puščica) izhajajo iz jadrne ovojnice. B: Jedro s praznimi prostori, ki so mesta nekondenziranega kromatina (puščica) in večji predel s kosmičastim materialom (zvezdica). C: Membranski svitki so zgrajeni iz koncentrično urejenih membran. D: Večja povečava slike C. E: | |

| | |
|--|----|
| Membranski svitki zavzemajo velik del jedra. F: Velika povečava dvojnih membran s septalnimi kompleksi (puščica) in tankimi membranami (glava puščice). <i>Legenda</i> : A - Akrosom, N - Jedro, MW - Membranski svitki ali angl. membrane whorls | 30 |
| Sl. 9: Odvečna jedrna ovojnica v predelu vratu spermija (puščica). <i>Legenda</i> : N - Jedro, A - Akrosom, RNE - Odvečna jedrna ovojnica, M - Mitohondriji | 30 |
| Sl. 10: Prečni prerezi spermijev normalnih vzorcev (A, B, C) z večjimi vakuolami ali membranskimi svitki (angl. membrane whorls ali MW). A,B: Akrosomska membrana je v stiku z jedrno ovojnico (puščica). C: Membranski svitki z dodatnimi membranami med jedrom in akrosomom (glava puščice). D: Spermij z nenormalno morfologijo in večim področjem nekondenziranega kromatina (puščica). <i>Legenda</i> : A - Akrosom, N - Jedro, C - Citoplazma, MW - Membranski svitki ali membrane whorls | 31 |
| Sl. 11: A: Nepravilno razvit akrosom in ostanki citoplazme okoli jedra. B: Nepravilno razvit akrosom in področja nekondenziranega kromatina v jedru. <i>Legenda</i> : N - Jedro, A - Akrosom, C - Citoplazma , M - Mitohondriji, Ak - Aksonema | 32 |
| Sl. 12: A, B, C, D : Spermiji normalnih (N) vzorcev semena z nepravilno morfologijo. Kromatin je granuliran in manj kondenziran s številnimi praznimi prostori (bele puščice). Akrosom je nepravilno razvit (A), delno razvit (D) in včasih povezan z membranskimi svitki (B). C: Ukrivljen vrat. <i>Legenda</i> : A - Akrosom, N - Jedro | 33 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|------------------|--|
| * | kosmičast material v jedru spermija |
| I | spermiji razreda I |
| II | spermiji razreda II |
| III | spermiji razred III |
| IV | spermiji razreda IV |
| A | akrosom |
| DIC | angl. differential interference contrast / slov. diferencialna interferenčna kontrastna mikroskopija |
| DNK | deoksiribonukleinska kislina |
| ET | angl. embryo transfer / slov. prenos zarodka |
| ICSI | angl. intracytoplasmic sperm injection / slov. neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice |
| IMSI | angl. intracytoplasmic morphologically selected sperm injection / slov. neposredni vnos morfološko izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice |
| IVF | <i>in vitro</i> fertilizacija; zunajtelesna oploditev; umetna oploditev |
| IVF-ET | zunajtelesna oploditev s prenosom zarodka v maternico |
| JC | jajčna celica |
| M | mitohondriji |
| MSOME | angl. motile sperm organelle morphology examination / slov. pregled morfologije organelov gibljivega spermija |
| MW | angl. membrane whorls / slov. membranski svitki |
| N | normozoospermija |
| N (mikrografije) | angl. nucleus / slov. jedro |
| P | statistična značilnost |
| SZO/WHO | slov. Svetovna zdravstvena organizacija / angl. World Health Organization |
| T | teratozoospermija, nenormalna morfologija spermijev |
| TEM | angl. transmission electron microscopy / slov. presevna elektronska mikroskopija |
| V | vakuola |

SLOVARČEK

| | |
|-------------------------------------|---|
| Akrosom | Del glave spermija, ki je obdan z akrosomalno membrano, v kateri so encimi (akrozin, hialuronidaza), potrebni za razgradnjo jajčnih ovojnici ob oploditvi; encimi se sprostijo iz akrosoma v procesu akrosomske reakcije |
| Akrosomska reakcija | Sprostitev vsebine akrosoma (encimov) ob zlitju zunanje akrosomske membrane in plazmatske membrane spermija; encimi razgradijo jajčne ovojnice in spermij lahko prodre v notranjost jajčne celice |
| Aksonema | Snop mikrotubulov, ki poteka skozi rep spermija; v glavnem delu repa je 9 parov perifernih in 1 par centralnih mikrotubulov; omogoča gibanje repa |
| Blastocista | Zarodek, ki ima dve različni liniji celic (trofoblast in embrioblast) in votlinico (blastocel); celice v blastocisti se že diferencirajo; zarodek doseže stanje blastociste 5. dan po oploditvi; zarodek se v maternico ugnezdi na razvojni stopnji blastociste, kar je zadnja razvojna stopnja zarodka, ki še živi in se razvija v pogojih <i>in vitro</i> |
| Centriol | Znotrajcelični organel, ki je pomemben za nastanek delitvenega vretena med mejozo; v jajčno celico pride s spermijem; pomemben za zblizjanje in zlitje pronukleusov |
| Citoplazemski ostanek | Ostanek citoplazme v srednjem delu spermija; posledica nepopolne spermatogeneze; nezrelost spermija |
| Delež oplojenih jajčnih celic | Se izračuna kot število oplojenih jajčnih celic na število zrelih celic |
| Delež blastocist | Se izračuna kot število blastocist na število zarodkov |
| DNA | Deoksiribonukleinska kislina; dvooverižna molekula; nosilka genetske informacije; večinoma v jedru ali mitohondriju |
| Fragmentacija DNA | Prelomi dvooverižne molekule DNA |
| Gameta | Spolna celica; pri ženski jajčna celica; pri moškem spermij |
| Klasični parametri kakovosti semena | Spermiogram: Koncentracija, gibljivost, morfologija spermijev |
| Kromatin | DNA-proteinski kompleks v evkariotski celici; DNA je navita okoli proteinov (histoni, pri spermiju protamini) |
| Krugerjevi strogi kriteriji | Kriterij za ocenjevanje morfologije spermijev; po kriteriju mora vsebovati normalno seme vsaj 14% morfološko normalnih spermijev |

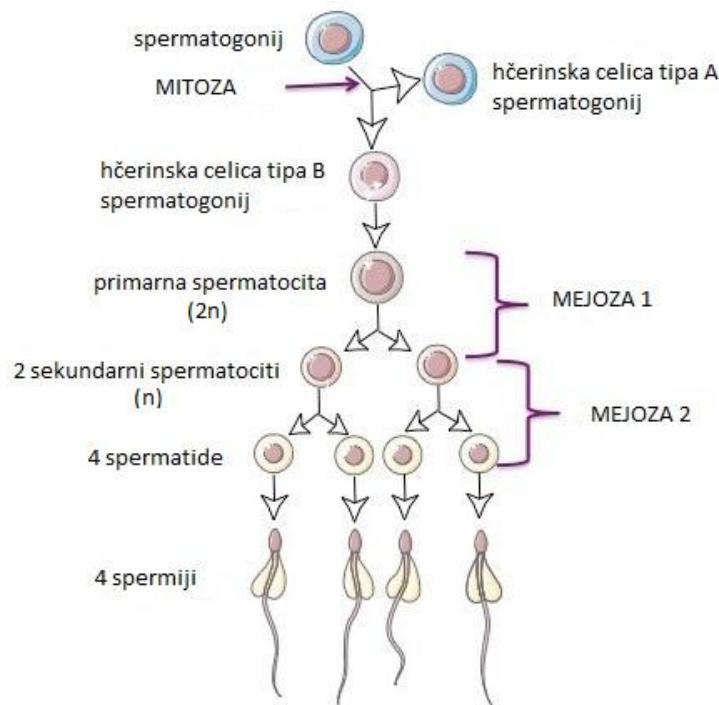
| | |
|-----------------------|--|
| Mikroskopija TEM | Presevna elektronska mikrokopija, s katero je mogoče opazovati ultrastrukturo celic pri visoki povečavi |
| Mejoza | Redukcijska delitev; vrsta celične delitve, pri kateri se število kromosomov v hčerinski celici zmanjša in pride do izmenjave genetskega materiala ozziroma novih kombinacij v genetskem zapisu; v procesu mejoze nastanejo gamete |
| Mitoza | Celična delitev; pred mitozo se DNA podvoji in med mitozo nastaneta dve hčerinski celici, ki imata enako število kromosomov kot materinska; delitev značilna za večino somatskih celic |
| Moška neplodnost | Odsotnost spermijev ali nezmožnost spermijev za oploditev jajčne celice; slaba kvaliteta semena ali protitelesa proti spermijem |
| Oploditev | Spojitev ženske in moške spolne celice; spojitev jajčne celice in spermija |
| Postopek ICSI | Neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice; najpomembnejša metoda zdravljenja moške neplodnosti |
| Postopek IMSI | Nadgradnja metode ICSI; pri postopku se za vnos spermija v citoplazmo jajčne celice izbere morfološko najbolj normalen spermij, izbran pod 6000-kratno povečavo |
| Postopek IVF | Fertilizacija <i>in vitro</i> , umetna oploditev, zunajtelesna oploditev; klasična zunajtelesna oploditev z osemenitvijo jajčne celice; izvaja se v primeru ženske neplodnosti in normalne kakovosti semena pri partnerju |
| Postopek IVF-ET | Fertilizacija <i>in vitro</i> s prenosom zarodka v maternico |
| Semenski izliv (seme) | Ejakulirana semenska tekočina s spermiji; vsebuje tudi epitelijske celice sečnice, levkocite, eritrocite, zarodne celice |
| Spermatida | Haploidna celica, ki se v procesu spermogeneze razvije v spermij |
| Spermatogeneza | Nastajanje moških gamet ozziroma spermijev v modih |
| Spermij | Moška spolna celica, gameta |
| Spermogeneza | Razvoj spermatid v spermije; del spermatogeneze |
| Spermogram | Laboratorijska ocena kakovosti semena: volumen, vrednost pH, viskoznost, barva, koncentracija spermijev (milijoni/mL), število, gibljinost, morfologija, vitalnost spermijev |
| SpermSlow® | Gojišče za upočasnitev gibanja spermijev; vsebuje hialuronsko kislino, na katero se vežejo zreli spermiji in se na mestu gibljejo; pomembno gojišče za postopek IMSI |

| | |
|--------------------|--|
| Stopnja nosečnosti | Se izračuna kot število žensk, ki so zanosile na postopek |
| Stopnja oploditve | Se izračuna kot število jajčnih celic, ki so se oplodile na vse jajčne celice |
| Vakuola | Celični organel, s celičnim sokom napoljen prostor v notranjosti celice, kamor se začasno ali stalno odlagajo snovi, ki ob presnovi nastajajo v citoplazmi |
| Zarodek | Majhen skupek celic, ki nastane iz oplojene jajčne celice in se razvije v nov organizem |

1. UVOD

Spermiji so gibljive moške spolne celice, ki nastanejo v procesu spermatogeneze (Slika 1). Razvoj gonad, kjer spermatogeneza poteka, se začne že v zgodnjem obdobju zarodka ter nadaljuje vse do pubertete, ko moški spolno dozori. V semenskih cevkah se razvijejo nediferencirane spolne celice ali spermatogoniji, ki se začno po puberteti mitotsko deliti in tvoriti primarne spermatocite, ki se dalje mejotsko delijo. Po prvi mejotski delitvi iz diploidne primarne spermatocite nastaneta dve haplodni sekundarni spermatociti. Med mejozo se reducira število kromosomov iz diploidnega v haploidno in pride do izmenjave genetskega materiala. Po drugi mejotski delitvi nastanejo štiri haploidne okrogle spermatide.

Med procesom zorenja moških spolnih celic ali spermiogenezo, se spermatide preoblikujejo in dozorijo v gibljive spermije z akrosomom, močno kondenziranim kromatinom (histoni se nadomestijo s protamini) in zmanjšano količino citoplazme. Zorenje spermijev poteka zaradi fizioloških sprememb tudi pri prehodu skozi moda in nadmodek.



Slika 1: Spermatogeneza ali nastanek moških gamet (prirejeno po spletnem viru: repropedia.org)

Proces spermatogeneze je stalen in nastanek gibljivega spermija iz spermatogonija traja pri človeku približno 2 meseca. Ob normalni spermatogenezi prične nov cikel diferenciacije vsak dan približno 1,5 milijonov spermatogonijev. V reproduktivnem obdobju moškega tako nastane približno 30 milijonov spermijev vsak dan (Virant-Klun in sod., 2002a).

Nepravilnosti v spermatogenezi vodijo v nastanek semena slabše kakovosti, ki je pogosto povezana z moško neplodnostjo. Lahko gre za majhno število spermijev (oligozoospermijo), slabo gibljivost spermijev (astenozoospermijo) ali poslabšano morfologijo spermijev (teratozoospermijo). Za opazovanje natančne morfologije živih spermijev se lahko uporablja metoda *motile sperm organelle morphology examination* (MSOME), ki vključuje uporabo diferencialne interferenčne kontrastne mikroskopije (DIC) pri veliki povečavi $> 6000\times$. Metoda omogoča opazovanje večjih in manjših vakuol v področju glave spermija, ki bi drugače ostale neopažene. Vakuole se pojavljajo na različnih mestih glave spermija, so različno velike in v različnem številu. Številne raziskave kažejo, da lahko vplivajo na naravno plodnost moškega in na izid postopka zunajtelesne oploditve pri parih z najtežjimi oblikami neplodnosti. Mnenja o sami naravi vakuol so deljena in še vedno ni povsem znano ali so le-te jedrnega ali akrosomskega izvora. Domneva se, da so vakuole povezane z nepravilno kondenziranim kromatinom, porušeno integriteto DNA (fragmentacijo) ter aneuploidijami (nepravilnim številom kromosomov). Nekatere raziskave so pokazale, da imajo spermiji z vakuolami v glavi manjši potencial oploditve ter lahko vodijo v razvoj zarodka slabše kakovosti.

2. PREGLED OBJAV

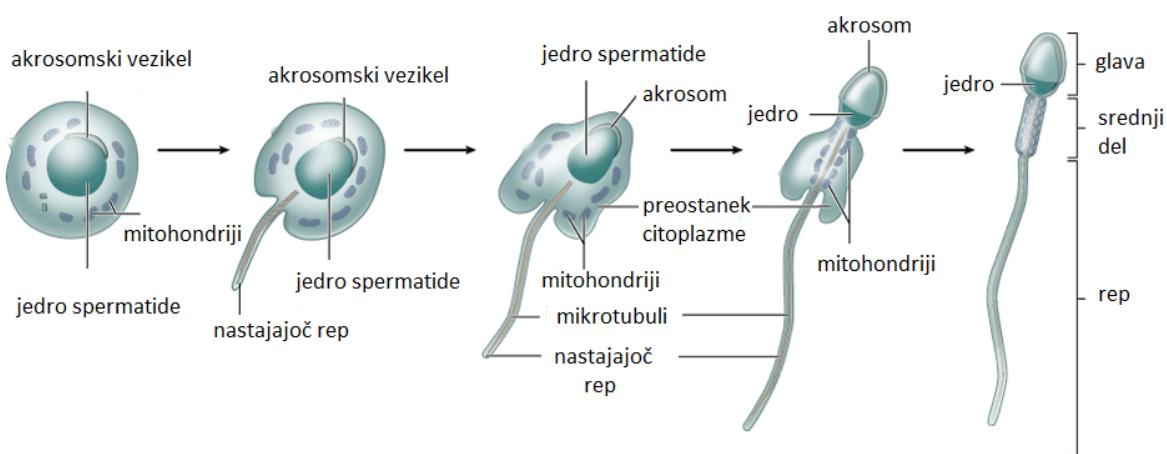
2.1. SPERMIJ IN SEME

2.1.1. Spermiogeneza

Nastanek moških spolnih gamet (spermatogeneza) je proces, ki poteka v modih in vključuje tudi diferenciacijo gamet ali spermiogenezo. Med spermiogenezo se haploidna, okroglia gameta morfološko močno preoblikuje in se razvije v spermij (Slika 2). Nukleoproteini histoni se nadomestijo s protamini in sprememba v beljakovinah omogoči boljšo kondenzacijo jedrne DNA. Jedro se podaljša in jedrna ovojnica se ob preoblikovanju jedra močno zmanjša. Med zorenjem spermatide pridobijo dolg rep, biček z aksonemo, ki nastane iz centriola, in izgubijo večino citoplazme. V srednjem delu spermija se zberejo mitohodriji, kjer prihaja do razgradnje energijsko bogatih snovi, ki se porabijo pri aktivnem premikanju bičkov spermijev.

Razvoj akrosoma je dinamičen proces, kjer močno sodelujeta Golgijev aparat in jedrna ovojnica. Že v zgodnjih spermatidah se iz Golgijskega aparata oblikujejo Golgijski vezikli, ki se med spermiogenezo zlijejo v akrosomske vezikel (Slika 2). S pomočjo proteinov perinukelarnega materiala se akrosomske vezikel zasidra ob anteriornem delu jedra spermija. Med maturacijo dozori v zrel akrosom, ki obdaja dve tretjini površine jedra in je napolnjen z litičnimi encimi, ki ob oploditvi razgradijo ovojnico jajčne celice (povzeto po Sedo et al., 2012).

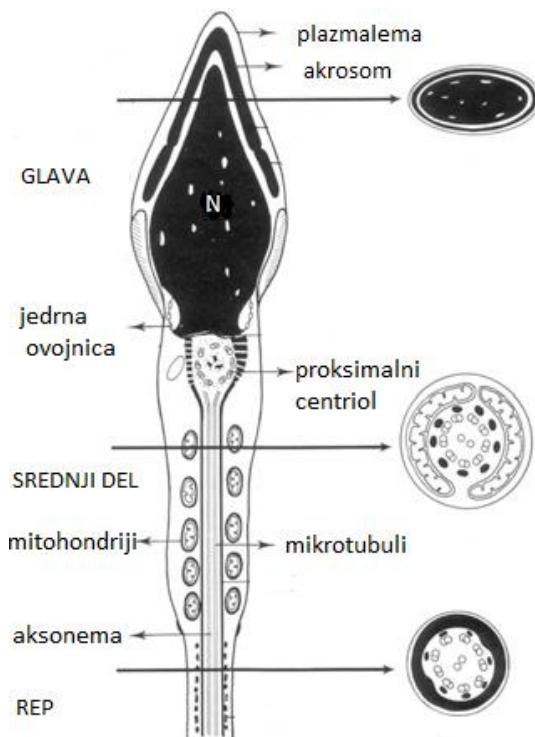
Spermiji, ki se sprostijo iz moda, še niso sposobni oploditve, temveč dozorevajo na poti skozi nadmodek. Na poti pride do številnih morfoloških, fizioloških in metabolnih sprememb in postopnega pridobivanja oploditvene sposobnosti. Spermiji iz mod se lahko uporabijo v postopku zunajtelesne oploditve (z metodo neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice), kar lahko vodi v nosečnost in rojstvo otroka.



Slika 2: Spermiogeneza ali diferenciacija moških gamet (prirejeno po Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12. izdaja)

2.1.2. Morfologija spermija

Spermij je majhna, gibliva moška gameta, ki se v procesu oploditve združi z jajčno celico. Morfološko je zgrajen iz ovalne glave, vrata, srednjega dela in repa, ki mu omogoča premikanje vzdolž ženskega genitalnega trakta (Slika 3).



Slika 3: Zgradba zrelega spermija; N - jedro (prirejeno po Sathananthan et al., 2013)

Glava spermija je dolga od 4.0 do 5.0 μm in široka od 2.0 do 3.0 μm . Dve tretjini sprednjega dela glave pokriva akrosom napolnjen z litičnimi encimi, ki se ob oploditvi sprostijo in razgradijo ovojnico jajčne celice. Večji del glave spermija predstavlja jedro obdano z jedrno ovojnicico, ki vsebuje močno kondenziran kromatin.

Glava in srednji del spermija sta povezana z vratom, kjer se nahaja preostanek jedrne ovojnice, preostanek citoplazme in proksimalni centriol.

V srednjem delu spermija, ki je dolg okoli 5 μm in širok okoli 1 μm , se nahajajo mitohondriji in aksonema. Mitohondriji zagotavljajo energijo za aktivno gibanje spermija, aksonema pa tvori osnovo biča (9 parov obrobnih in 1 par centralnih mikrotubulov), ki spermijem omogoča gibanje. Rep je obdan s fibrozno ovojnicico in dolg okoli 45 μm ter širok okoli 0.5 μm .

Po merilih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, 2010) je glava morfološko normalnega spermija ovalna in meri v dolžino 4.0 - 5.0 μm ter v širino 2.5 - 3.5 μm . Akrosomski del je dobro definiran in obsega 40 - 70 % površine glave. Srednji del je vitek, v osi pritrjen na glavo, širok manj kot 1 μm in dolg približno ena in pol krat velikosti glave. Rep je raven, uniformen, ožji kot srednji del in dolg približno 45 μm (WHO, 2010, Virant Klun in sod., 2002a).

2.1.3. Vakuole v glavi spermijev

Morfološka značilnost človeških spermijev so tudi vakuole v predelu glave. Z invertnim svetlobnim mikroskopom (DIC-Nomarski) se pri 6000X povečavi vakuole vidijo kot večje ali manjše površinske ugreznitve. Izvor vakuol je nejasen in ni povsem znano ali le-te izvirajo iz jedra, akrosoma ali drugih membranskih struktur. Vakuole v glavah spermijev so prisotne tudi v vzorcih semena normalne kakovosti ($> 14\%$ morfološko normalnih spermijev po Krugerjevih strogih kriterijih) in se običajno nahajajo na sprednjem ali srednjem delu glave (Wantabe in sod., 2011).

Tri-dimenzionalna dekonvolucijska mikroskopija z obarvano DNA je prikazala vakuole kot "jedrne ugreznitve" in mikroskopija na atomsko silo je razkrila nedotaknjeno in rahlo ugreznjeno plazmalemo (Boitrelle in sod., 2011). Transmisijski elektronski posnetki vzorcev semena moških z nenormalno morfologijo spermijev ali teratozoospermijo (< 14 % normalnih spermijev po strogih Krugerjevih kriterijih) so pokazali, da so vakuole prisotne v sprednjem in srednjem delu glave spermija, izključno v področju jedra (Perdix in sod., 2011).

Pojavljanje vakuol v sprednjem delu glave spermijev je sprožilo ugibanja o možnem akrosomskem izvoru vakuol. Po indukciji akrosomske reakcije s kalcijevim ionoforom A23587 (Kacem in sod., 2010), folikularno tekočino in hialuronsko kislino (Montjean in sod., 2012) se je pojavljanje vakuol v semenu zmanjšalo, kar kaže na to, da bi vakuole lahko predstavljale del akrosoma. Kljub temu pa so vakuole prisotne tudi v glavah spermijev brez akrosoma (globozoospermija) in tako morda le niso akrosomskega izvora (Gatimel in sod., 2012).

Franco s sodelavci (2008) je pokazal, da spermiji z velikimi vakuolami v glavah (> 13 % glave spermija) vsebujejo več fragmentirane DNA kot spermiji z manjšimi vakuolami in pogosteje se pojavljajo kromosomske napake (Perdix in sod., 2011). Vakuole, opazovane pri veliki povečavi svetlobnega invertnegra mikroskopa, so opisane kot "žepkaste jedrne ugreznitve", povezane z napakami v kondenzaciji kromatina (Boitrelle in sod., 2013; Perdix in sod., 2011). Nasprotno pa nekatere raziskave niso potrdile povezav med velikimi vakuolami v glavah spermijev in porušeno integriteto DNA ali kromosomskimi napakami (Wantabe in sod., 2011).

Vakuole v glavah spermijev bi lahko bile povezane s procesom razvoja oziroma dozorevanja spermijev. Jedro spermija se med spermiogenezo preoblikuje, za kar so potrebni nukleoproteini in perinuklearni material, ki sodeluje pri oblikovanju akrosoma (Escalier, 1990). Jedro se močno zmanjša in nukleosomi se urejeno razporedijo po genomu. Nukleosomska DNA lahko ostane povezana z nuklearnim matriksom, kar se na elektronskih mikrografijah vidi kot "prazen prostor" (Johanson in sod., 2011). V poznih fazah spermiogeneze postane DNA močno kondenzirana in nukleoproteine histone

nadomestijo protamini (Haraguchi in sod., 2007). Med zamenjavo nukleoproteinov nastane tudi veliko začasno delujočih proteinov, ki se po opravljeni funkciji razgradijo. Kot proteolitični centri, od koder proteinski ostanki zapustijo jedro, verjetno delujejo nuklearni žepki na bazi glave spermija. Ti bi lahko bili funkcionalno povezani tudi z vakuolami v glavi spermijev (Haraguchi in sod., 2007, Chemez in sod., 2012).

Vakuole v glavi spermijev predstavljajo merilo kakovosti semena, čeprav njihov izvor in povezava z neplodnostjo nista pojasnjena. Nekateri avtorji menijo, da vakuole v glavi spermijev predstavljajo del normalne spermiogeneze (Wantabe in sod., 2011; Tanaka in sod., 2012), medtem ko jih drugi avtorji opisujejo kot degenerativne strukture povezane z moško neplodnostjo (Boitrelle in sod., 2011; Bartoov in sod., 2003; DeVos in sod., 2013). Več raziskav kaže, da je prisotnost vakuol povezana z moško neplodnostjo oziroma s slabšim rezultatom zunajtelesne oploditve pri moških s slabo kakovostjo semena (Berkovitz in sod., 2006; Vanderzwalmen in sod., 2008; Knez in sod., 2011).

2.2. NEPLODNOST IN ZUNAJTELESNA OPLODITEV

2.2.1. Moška neplodnost

Mnogi pari se srečujejo z neplodnostjo in težavami pri zanositvi. Pri dveh tretjinah neplodnih parov, ki vstopajo v postopek zunajtelesne oploditve, se moška neplodnost pojavlja samostojno ali v povezavi z žensko neplodnostjo. Po merilih Svetovne zdravstvene organizacije je par zmanjšano ploden, če ženska ne zanosi po 12 mesecih normalnih spolnih odnosov brez uporabe kontracepcije. Če je vzrok za neplodnost slaba kakovost semena, pa govorimo o moški neplodnosti, ki je lahko prirojena ali pridobljena. Pri neplodnih moških je slaba kakovost semena lahko posledica vnetij, poškodb, genetskih motenj, motenj v spuščanju mod, operativnih posegov ali zdravljenja (predvsem maligne bolezni), venar pri mnogih neplodnih moških razlog neplodnosti ostaja neznan.

Slaba kakovost semena je lahko posledica številnih dejavnikov kot so starost moškega, teža, ITM (indeks telesne mase), slabe življenske navade kot so kajenje, uživanje

alkohola, pogostost ejakulacije, spolna abstinencia, prehrana, itd. Višja starost moškega (> 41 let) lahko negativno vpliva na kakovost semena, saj so v semenu pogosteje prisotni spermiji z velikimi vakuolami v glavah (Silva in sod., 2012). Pri starejših in predebelih moških (visok ITM) so redkeje prisotni optimalni spermiji brez vakuol ali z največ dvema majhnima vakuolama (Wogatzky in sod., 2012). Kombinacija različnih življenjskih navad moškega ima verjetno pomemben vpliv na kakovost semena, ne le na gibljivost in številčnost spermijev, temveč tudi na prisotnost vakuol v glavah spermijev (Wogatzky in sod., 2012).

Prvi korak pri zdravljenju neplodnosti je ocena kakovosti semena oziroma spermiogram. Pri tem se oceni viskoznost, barvo, pH in volumen semenskega izliva ter koncentracijo, število, gibljivost, vitalnost in morfologijo (obliko) semenčic (povzeto po Knez, 2009; Virant - Klun in sod., 2002a).

Seme je normalno, če je v semenu 15 milijonov ali več spermijev na mililiter, če je gibljivih 50 % ali več spermijev in če je v semenu 4 % ali več spermijev z normalno morfologijo. Če je v semenu manj kot 15 milijonov spermijev na mililiter, govorimo o oligozoospermiji. O astenozoospermiji govorimo, če je v semenu manj kot 50 % gibljivih semenčic, o teratozoospermiji pa govorimo v primeru slabe morfologije semenčic, kjer je manj kot 4 % spermijev z normalno morfologijo po kriterijih SZO oziroma manj kot 14 % morfološko normalnih spermijev po strogih Krugerjevih kriterijih. Omenjene nepravilnosti so pogosto med seboj povezane in takrat govorimo o oligostenoteratozoospermiji (OAT). Moška neplodnost je lahko tudi posledica nekrozoospermije, kjer je vitalnost spermijev slaba in je večina spermijev v izlivu mrtvih. Najtežja oblika moške neplodnosti pa je azoospermija, kjer v semenskem izlivu ni prisotnih spermijev. Pri nekaterih moških je možno pridobiti spermije iz mod z biopsijo in izvesti uspešen postopek zunajtelesne oploditve s temi spermiji. Pri deležu moških z azoospermijo pa tudi v modih ni prisotnih spermijev, zato postopek zunajtelesne oploditve ni mogoč in ne morejo imeti biološkega potomca (povzeto po Virant - Klun in sod., 2002a).

Po strogih Krugerjevih kriterijih je moški neploden že, če ima v semenu manj kot 14 % morfološko normalnih spermijev. Ta kriterij se upošteva pri izbiri postopka zaunajtelesne

oploditve. Pri moških z manj kot 14 % morfološko normalnih spermijev se običajno izvaja bolj zahteven postopek zunajtelesne oploditve, imenovan neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI). Morfološko normalen spermij ima po omenjenih kriterijih ovalno glavo dolžine 4.0 - 5.0 µm in širine 2.5 - 3.0 µm. Akrosomski del mora biti dobro izražen in obsegati 40 - 70 % površine glave. Srednji del je velik 6 - 10 µm. Rep mora biti dolg približno 45 µm. Če je katerokoli od teh parametrov na meji, je spermij ocenjen kot nenormalen.

2.2.2. Zunajtelesna oploditev

Za zdravljenje moške neplodnosti so bili razviti posebni postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo. Mednje štejemo umetno osemenitev (intrauterino inseminacijo IUI) s partnerjevim semenom (homologna inseminacija) ali darovalčevim semenom (heterologna inseminacija) in zunajtelesno oploditev s prenosom zarodka (IVF-ET). Pri umetni osemenitvi se seme pripravi na poseben način in s katetrom vbrizga v maternico. Postopek je primeren za zdravljenje parov z zmerno poslabšano kakovostjo semena. Za zdravljenje težjih oblik moške neplodnosti, kamor spada tudi teratozoospermija, se uporablajo metode zunajtelesne oploditve, med katerimi je najbolj uspešna metoda neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI), kjer se s posebnim, invertnim mikroskopom pri 200 - 400x povečavi s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja, v vsako jajčno celico vnese oziroma mikroinjicira po en spermij. Postopek ICSI omogoča oploditev jajčnih celic in zanositev tudi s spermiji, pridobljenimi iz nadmodka ali mod pri moških z azoospermijo (povzeto po Virant - Klun in sod., 2002a).

S svetlobnim invertnim mikroskopom (pri običajni 400X povečavi, pri kateri se izvaja metoda ICSI), ostanejo fine morfološke strukture oziroma nepravilnosti spermija nevidne in je selekcija spermijev za oploditev nemogoča. Posledično je bila razvita nova metoda opazovanja in selekcije spermijev pri veliki povečavi, imenovana MSOME (angl. *motile sperm organelle method examination*) (Bartoov in sod., 2002). Pri tej metodi se uporablja invertni svetlobni mikroskop (DIC Nomarski, >6000X povečava), pri čemer lahko opazujemo žive, nebarvane spermije. Vakuole v glavah spermijev so pri tem vidne kot majhne ali večje površinske ugreznitve.

Nadgradnja metode opazovanja in selekcije spermijev pri veliki povečavi (MSOME) je neposredni vnos morfološko izbranega spermija v jajčno celico ali metoda IMSI (angl. *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*). Pri tej metodi se morfološko normalni spermiji, izbrani po metodi MSOME, s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja pod invertnim svetlobnim mikroskopom vnesejo oziroma mikroinjicirajo v jajčne celice partnerice (v vsako jajčno celico po en spermij). Po oploditvi se jajčne celice goji v posebnem gojišču v CO₂-inkubatorju (37 °C, 6 % CO₂). Ko se zarodki razvijejo do razvojne stopnje blastociste (5. dan), se en ali največ dva zarodka na razvojni stopnji blastociste ali morule preneseta v maternico (Virant-Klun in sod., 2002a). Nadstevilni zarodki, ki se razvijejo do te razvojne stopnje, se globoko zamrznejo in shranijo v tekočem dušiku za kasnejši prenos v maternico.

2.2.3. Vpliv vakuol v glavah spermijev na izid zunajtelesne oploditve

Morfološko normalni spermiji imajo gladko, simetrično, ovalno glavo in izbokline, zato ugreznitve jedrne mase oziroma vakuole kažejo na nepravilnosti (Bartoov in sod., 2003). Prisotnost velikih vakuol ali večjega števila vakuol v glavah spermijev ima negativen vpliv na razvoj zarodkov do razvojne stopnje blastociste v programu zunajtelesne oploditve (Vanderzwalm en sod., 2008; Knez en sod., 2012). Izguba zarodkov po ugnezditvi v maternico je pogosteša po oploditvi s spermiji z vakuolami v glavah (Berkovitz en sod., 2005, 2006). Pojav vakuol v glavah spermijev je povezan tudi z zgodnjim splavom (Berkovitz en sod., 2006). Kljub temu pa prisotnost ene velike ali več vakuol v glavah spermijev ni uporaben dejavnik pri napovedovanju uspešnosti zanositve oziroma nosečnosti (Lopez en sod., 2013).

2.3. NAMEN DELA

V magistrski nalogi smo s svetlobnim invertnim mikroskopom (DIC Nomarski, >6000X povečava) pregledali 40 normalnih (N) in 41 nenormalnih (T; s slabo morfologijo spermijev) pripravljenih vzorcev semena, ki so ostali po zunajtelesni oploditvi in 200 spermijev vsakega vzorca razdelili v Razrede I, II, III in IV, glede na morfologijo in

značilnosti vakuol v glavah. Na ultrastrukturnem nivoju smo s pomočjo presevnega elektronskega mikroskopa pregledali 10 normalnih (N) in 6 nenormalnih (T) vzorcev semena, ki so ostali po zunajtelesni oploditvi (IVF ali ICSI). Zanimalo nas je, ali na nastanek vakuol v glavah spermijev vplivajo moški dejavniki kot so teža, višina, ITM (indeks telesne mase), starost ter kajenje, zato smo podatke pacientov primerjali z našimi podatki o prisotnosti vakuol v glavah spermijev v semenu. Prav tako smo klasične parametre spermograma (volumen, koncentracija, gibljivost, morfologija spermijev) primerjali s pojavnostjo vakuol v glavah spermijev oziroma z deleži spermijev posameznega Razreda (I - IV) glede na pojavnost vakuol.

Nenazadnje nas je zanimalo tudi ali prisotnost vakuol v glavah spermijev v vzorcih semena vpliva na izid postopka zunajtelesne oploditve.

Glavni cilji naloge :

1. Ugotoviti, ali so vakuole v glavah spermijev prisotne v vzorcih semena normalne in slabe kakovosti pri moških, vključenih v program zunajtelesne oploditve.
2. Opisati ultrastrukturo vakuol v glavah človeških spermijev
3. Ugotoviti, ali moški dejavniki vplivajo na pojav vakuol v glavah spermijev.
4. Ugotoviti, ali obstaja povezava med vakuolami v glavah spermijev in klasičnimi parametri spermograma.
5. Ugotoviti, ali vakuole v glavah spermijev vplivajo na izid postopka zunajtelesne oploditve: klasičnega postopka zunajtelesne oploditve (IVF) in neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI).

Delovne hipoteze:

Predpostavili smo:

1. vakuole so prisotne v glavah spermijev tako v semenu normalne kakovosti kot v semenu slabe kakovosti.
2. seme slabše kakovosti (teratozoospermija) vsebuje več vakuol v glavah spermijev.
3. vakuole v glavah spermijev so strukturne značilnosti jedra.
4. višja starost moškega, prevelika telesna masa (ITM) ter kajenje negativno vplivajo na kakovost semena in so povezani z več vakuolami v glavah spermijev.

5. uspešnost postopka zunajtelesne oploditve je boljša pri normalnih semenskih vzorcih oziroma pri vzorcih semena z manj vakuolami v glavah spermijev.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Biološki material

- semenski izliv moškega; 40 vzorcev semena normalne kakovosti odvzetih 40 moškim in 41 vzorcev semena slabe kakovosti odvzetih 41 moškim s poslabšano morfologijo spermijev - teratozoospermijo (< 14 % spermijev z normalno morfologijo po strogih Krugerjevih kriterijih)

3.1.2. Kemikalije

- Parafinsko olje (MediCult, Jyllinge, Denmark)
- SpermSlow™ (MediCult, Jyllinge, Denmark)
- Imerzijsko olje
- MiliQ voda (deionizirana voda)
- 25% GA (glutaraldehyd , SPI)
- 8% PA (paraformaldehyd, SPI)
- 0.1 M PB pufer, pH = 7,2
- OsO₄ (osmijev tetroksid, SPI)
- Etanol
- Aceton
- Agar (Agarose for routine use , Sigma)
- Agar 100 Resin Kit , Sigma (Agar 100 resin, DDSA - Dodecetyl succinic anhydride, MNA - Methyl nadic anhydride, BDMA- Benzyl dimethylamine)
- 4% vodni uranil acetat
- Nasičen svinčev citrat (Reynold)

3.1.3. Oprema

- Svetlobni oziroma invertni mikroskop Nikon ECLIPSE TE2000-S, DIC Nomarski optika

- Programska oprema NIS-Elements F
- Pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Epruvete (14 mL)
- Male plastične petrijevke (TC dish, NuncTM)
- Male steklene petrijevke (GWSt1000, Will Co, Wells, Amsterdam, The Netherlands)
- Presevni elektronski mikroskop Philips CM 100 (FEI Nizozemska)
- Digitalni kamери Bioscan 792 in Orius SC 200 (Gatan Inc., Washington, DC, USA)
- Programska oprema Digital Micrograph (Gatan Inc., Washington, DC, USA)
- Ultramikrotom Reichert Ultracut S (Leica)
- Mini Spin centrifuga (Eppendorf, Nemčija)
- Rotor
- Grelna plošča

3.2. METODE

3.2.1. Razvrščanje spermijev v razrede glede na prisotnost in značilnosti vakuol v glavah s pomočjo metode MSOME

Metoda MSOME je metoda opazovanja živih, nebarvanih spermijev pri >6000X povečavi, s pomočjo svetlobnega invertnegra mikroskopa (DIC Nomarski).

3.2.1.1. Priprava semenskega vzorca za opazovanje s svetlobnim invertnim mikroskopom

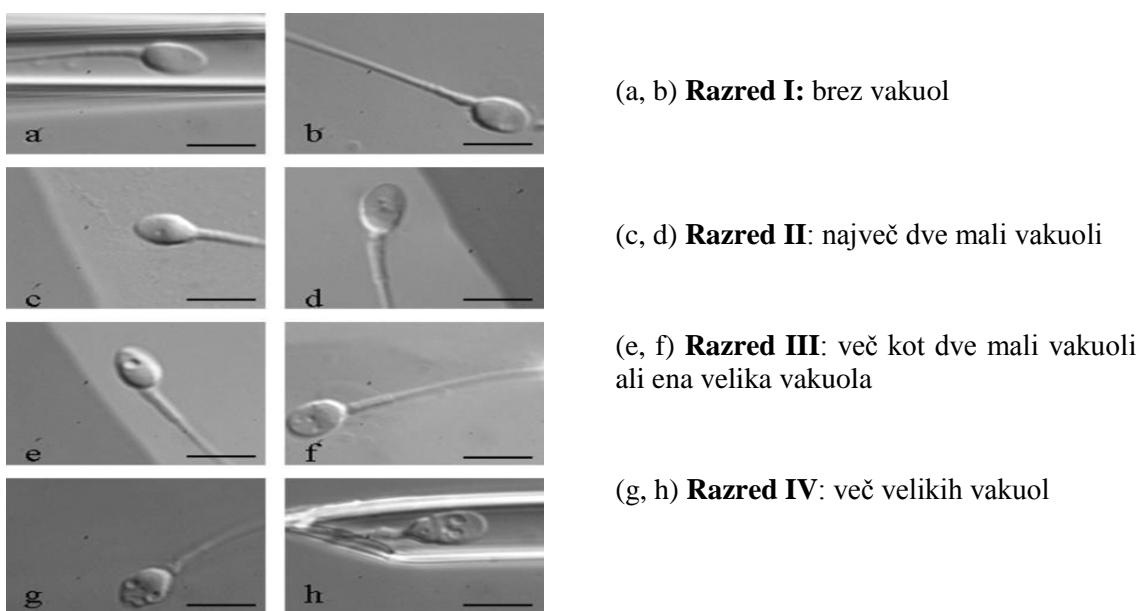
Ejakulirano seme je bilo pripravljeno po metodi priprave semena za zunajtelesno oploditev, ki vključuje tudi metodo *swim-up*, kjer se pridobi najbolj kakovostne spermije za oploditev (Knez, 2009). Na sredino male steklene petrijevke smo s pipeto kapnili 8 µL raztopine SpermSlowTM in kapljico razmazali v tanko črto. Glavna sestavina raztopine SpermSlow je hialuronska kislina, ki upočasni gibanje spermijev, da jih je lažje opazovati; zreli spermiji imajo namreč na površini izražene receptorje za hialuron in se vežejo nanj,

medtem ko nezreli spermiji ne. S pipeto smo odvzeli vrhnji del pripravljenega semena, ga kapnili na začetek razmaza raztopine SpermSlow ter počakali, da so se spermiji upočasnili oziroma vezali. Petrijevko smo prekrili s parafinskim oljem, da se vzorec med opazovanjem ni izsušil.

3.2.1.2. Opazovanje semena s svetlobnim invertnim mikroskopom pod 6000X povečavo (MSOME)

Spermije, vezane na raztopino SpermSlow, smo opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom Nikon ECLIPSE TE2000-S, opremljenim z DIC Nomarski optiko z 100x imerzijskim objektivom (numerična apertura = 1,5). Difrentialno interreferenčno kontrastno procesiranje svetlobe (DIC Nomarski optika) nam je omogočilo opazovanje finih morfoloških struktur spermijev pri veliki povečavi. Za opazovanje spermijev pri 6000X povečavi smo na dno petrijevke (pod kapljico SpermSlow) nanesli imerzijsko olje. Mikroskop je bil opremljen s posebno kamerjo, ki je sliko še dodatno povečala in v realnem času prikazala povečano vidno polje v programu *NIS-Elements*. Opazovana slika je rezultat optične povečave, ki je sestavljena iz povečave objektiva (100X) in numerične aperture objektiva (1,5) ter povečave video sistema (40X). Video povečava je definirana z dimenzijo diagonale zaslona in dimenzijo diagonale CCD čipa, v našem primeru 320 mm / 8 mm = 40. Spermiji so bili tako na ekranu približano 6000X povečani (povečava = 100 x 1,5 x 40) (povzeto po Berkovitz, 2005).

Pod veliko povečavo svetlobnega mikroskopa smo analizirali 40 vzorcev semena normalne kakovosti (N) in 41 vzorcev semena slabe kakovosti (teratozoospermija) tako, da smo 200 spermijev iz vsakega vzorca pregledali in ocenili prisotnost vakuol v glavah spermijev. Spermije smo klasificirali v Razrede I - IV glede na prisotnost, velikost in število vakuol, kot je prikazano na Sliki 4 (povzeto po Vanderzwalmen in sod., 2008).



Slika 4: Razvrščanje spermijev v razrede glede na značilnosti vakuol (Vanderzwalmen in sod., 2008)

3.2.2. Zunajtelesna oploditev

Pri normalnih vzorcih semena smo za zunajtelesno oploditev uporabili običajno IVF metodo z inseminacijo jajčnih celic, pri vseh pacientih z nenormalno kakovostjo semena pa smo uporabili metodo neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI), kot jo je opisala Knez (2009). Slednjo metodo so izvajali tudi pri nekaterih pacientih z normalno kakovostjo semena, v primeru manj uspešnega predhodnega postopka zunajtelesne oploditve. V raziskavi nismo izvajali metode IMSI za selekcijo spermijev za injiciranje v jajčne celice.

3.2.3. Opazovanje ultrastrukture vakuol spermijev s presevnim elektronskim mikroskopom

S presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) smo pregledali ultrastrukturne značilnosti 10 vzorcev semena z normalno kakovostjo (N) in 6 vzorcev semena s slabo kakovostjo oziroma teratozoospermijo (T), ki smo jih označili z zaporednimi številkami od 1 do 16, glede na kakovost semena je imel vzorec oznako N (normalna kakovost semena) ali T (teratozoospermija). Razen vzorca 16, ki je bil fiksiran tretji dan po ejakulaciji, so bili vsi

vzorci semena fiksirani na dan ejakulacije. Hitra fiksacija je ključna, saj se po podatkih iz literature lahko že po 2h pri 37 °C poveča število spermijev z vakuolami (Peer in sod., 2007).

3.2.3.1. Fiksacija vzorca semena in priprava ultra-tankih rezin

Fiksirali smo del vzorcev semena, ki so ostali po zunajtelesnih oploditvah. Vsakemu vzorcu smo dodali nekaj kapljic 0.1 M PB pufra in ga centrifugirali 10 min pri 300g. Previdno smo odstranili supernatant in vzorec takoj resuspendirali v primarnem fiksativu (2,5 % GA + 1% PA v 0.1 M PB , pH 7). Vzorec v ependorfki smo dobro premešali, da se je usedlina primerno raztopila v fiksativu in vzorec preko noči shranili v hladilniku na 4°C. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 10 min pri 500g. S tankimi Pasteurjevimi pipetami smo previdno odstranili supernatant, usedlino spermijev pa prekrili s kapljico 2 % agarja. Strjen agar s fiksiranimi spermiji smo razrezali na koščke velikosti 1 mm³, jih prenesli v 0.1 M PB pufer (pH 7), ki je bil ogret na sobno temperaturo in jih sprali 3x po 10 min z 0.1 M PB pufrom (pH 7). Sekundarna fiksacija v 1 % OsO₄ v 0.1 M PB je trajala 1,5 ure. Po spiranju v 0.1 M PB pufru (pH 7) je sledila dehidracija v alkoholni vrsti z naraščajočo koncentracijo: 25 %, 50 %, 70 %, 90 %, absolutni etanol ter dehidracija v zmesi absolutni etanol : aceton = 1:1 in acetonu. V mešanici acetona in smole Agar100 v razmerju 1:1 smo nato vzorčke pustili 2h. Preko noči smo vzorčke mešali na rotorju v smoli Agar100 z dodatkom akceleratorja BDMA. Naslednjo jutro smo vzorčke prestavili v modelčke za pripravo blokcev in jih prekrili z novo smolo Agar100. Polimerizacija je potekala 3 dni pri 60°C. Polimerizirane bloke smole smo z britvico ročno obrezali, z ultramikrotomom Reichert Ultracut S (Leica) in steklenim nožem smo naredili pol-tanke rezine (0,6 µ) in jih obarvali z barvilom Azur II - metilen modrim (Richardson). Z diamantnim nožem smo naredili ultra-tanke rezine (50 - 80 nm) in jih prenesli na bakrene mrežice. Rezine smo kontrastirali s 4 % w/v vodno raztopino uranil acetata (10 min), jih sprali v MiliQ vodi. Nato smo za 8 - 10 min mrežice prenesli na kapljice Reynoldsov svinčevega citrata, jih ponovno sprali v MiliQ vodi in pustili posušiti na zraku.

3.2.3.2. Opazovanje ultrastrukture spermijev in vakuol s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM)

Preparate smo pregledali s presevnim ali transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) Philips CM 100, pri povečavah od 1100 do 92000 x in pospeševalni napetosti 80 kV. Slike smo posneli s kamerama Bioscan 792 in Orius SC 200 (Gatan) in pri tem uporabili programsko opremo Digital Micrograph.

3.2.4. Statistična analiza podatkov

S pomočjo Hi-kvadrat testa smo vzorce semena z normalno kakovostjo (N) in nenormalno kakovostjo semena (T; slabo morfologijo spermijev) primerjali glede na delež spermijev z vakuolami v semenu in izid zunajtelesne oploditve.

S Spermanovim koeficientom korelacije smo delež "dobrih" spermijev (spermiji Razreda I in II), delež "slabih" spermijev (spermiji Razreda III in IV) ter delež spermijev posameznih razredov - Razred I, Razred II, Razred III in Razred IV (glede na število in velikost vakuol v glavah), primerjali s klasičnimi parametri semena (koncentracijo, gibljivostjo, morfologijo spermijev), moškimi dejavniki (volumen semena, levkocitospermija, starost, teža, BMI) in z izidom postopka zunajtelesne oploditve (stopnja oploditve, delež blastocist).

Izid zunajtelesih oploditev smo primerjali s kakovostjo semena in metodo zunajtelsne oploditve

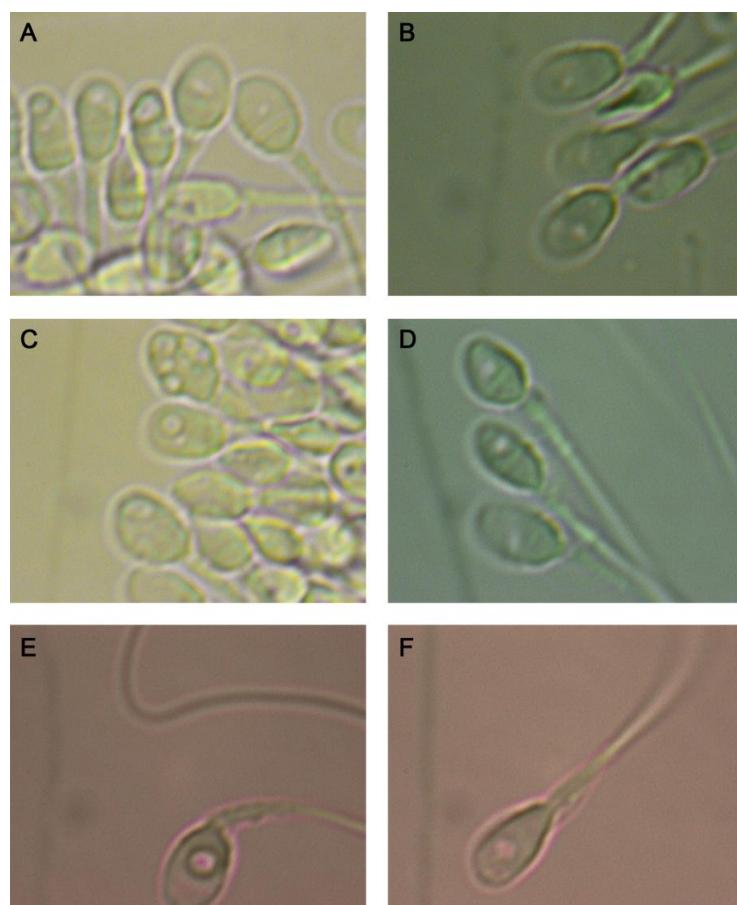
S pomočjo multivariatne logistične regresije smo preverili, ali je zanositev oziroma nosečnost odvisna od ženskih in moških dejavnikov, vključno z vakuolami v glavah spermijev. Razlike so bile statistično značilne pri $P < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. METODA PREGLEDA MORFOLOGIJE ORGANELOV GIBLJVEGA SPERMIJA S SVETLOBNIM MIKROSKOPOM (MSOME)

4.1.1. Vakuole v glavah spermijev, vidne s svetlobnim mikroskopom

Svetlobne mikrografije so pokazale, da so vakuole v glavah spermijev prisotne v vzorcih semena normalne kakovosti (Slika 5A, C, E), kakor tudi v vzorcih semena nenormalne kakovosti (Slika 5B, D, F). Po videzu so si bile vakuole zelo podobne pri obeh tipih vzorcev semena.



Slika 5: Vakuole v glavi spermijev v semenu normalne kakovosti (A, C, E) in nenormalne kakovosti (B, D, F). Svetlobna mikroskopija (DIC Nomarski), 6000-kratna povečava.

Pod veliko povečavo svetlobnega mikroskopa (6000X, DIC Nomarski) smo lahko v grobem opazili dva različna tipa vakuol: vakuole, ki so bile videti kot ugreznitve na površini glave spermija in svetlejša področja v notranjosti glave spermija. Oba tipa vakuol sta se pojavljala izključno v predelu glave spermija.

4.1.2. Vakuole v glavah spermijev, klasični parametri kakovosti semena in moški dejavniki

Rezultati so pokazali, da so vakuole prisotne tako v vzorcih semena normalne kakovosti (N), kot tudi nenormalne kakovosti (T; teratozoospermija, Preglednica 1). Seme nenormalne kakovosti (T) je vsebovalo večji delež spermijev z vakuolami (90,2 %) v primerjavi s semenom normalne kakovosti (N, 74,6 %), kar je razvidno iz Preglednice 1. Kljub temu, so vzorci semena normalne kakovosti (N) vsebovali relativno velik delež spermijev z vakuolami (74,6 %).

V vzorcih semena slabe kakovosti (T) je bilo statistično pomembno manj spermijev brez vakuol Razreda I in večji delež spermijev z vakuolami Razredov III in IV v primerjavi z vzorci semena normalne kakovosti (Preglednica 1).

Oba tipa vzorcev sta vsebovala podoben in velik odstotek spermijev Razreda II, z vsaj dvema majhnima vakuolama v glavi, to je (N 47,1 % in T 44,6 %), kar kaže, da so majhne vakuole morda del normalne morfologije spermijev pri človeku.

Preglednica 1: Primerjava klasičnih parametrov kakovosti semena in vakuol v glavi spermijev glede na kakovost semena (normozoospermija, teratozoospermija).

| | Normozoospermija | Teratozoospermija |
|--|--------------------------|------------------------|
| Število pacientov | 40 | 41 |
| Srednja koncentracija spermijev ($\times 10^6$ spz / ml) | 95.5 (min.50 - max.200.) | 48.4 (min.2- max.100) |
| Srednja gibljivost spermijev (% gibljivih spz) | 72.0 (min.50 - max.80) | 65.1 (min.14 – max.80) |
| Srednja morfologija spermijev (% spz z normalno morfologijo) | 35.6 (min.18 - max.67) | 8.0 (min.2 - max.13) |
| % spermijev z vakuolami v glavah | 74.6 * | 90.2 * |
| % spermijev Razreda I (brez vakuol) | 26.5 * | 9.7 * |
| % spermijev Razreda II (največ dve mali vakuoli) | 47.1 | 44.6 |
| % spermijev Razreda III (več kot dve mali vakuoli ali ena velika vakuola) | 25.4 ** | 37.8 ** |
| % spermijev Razreda IV (več velikih vakuol) | 2.1 * | 7.8 * |

*- statistično pomembna razlika ($P < 0.01$); po testu hi-kvadrat ,**- statistično pomembna razlika ($P < 0.05$); po testu hi-kvadrat

Analiza podatkov je pokazala, da obstaja statistično pozitivna povezava med koncentracijo, gibljivostjo ter morfologijo spermijev in deležem spermijev razreda I (spermiji brez vakuol). Izkazalo se je tudi, da obstaja statistično značilno pozitivna povezava med deležem "dobrih" spermijev v semenu glede na vakuole v glavah (Razred I + II) ter koncentracijo in morfologijo spermijev v semenu (Preglednica 2).

Obdelava podatkov je pokazala tudi, da obstaja statistično značilna negativna povezava med deleži spermijev Razredov III in IV ter morfologijo spermijev (Preglednica 2).

Statistično negativna povezava se je pokazala tudi med deležem spermijev Razreda IV in gibljivostjo spermijev (Preglednica 2).

Preglednica 2: Povezave med vakuolami v glavah spermijev (deleži spermijev Razredov I, II, III in IV) in klasičnimi parametri spermograma (koncentracija, gibljivost, morfologija spermijev), *Legenda:* N - število vzorcev semena

| Razred spermijev glede na vakuole v glavah | | Koncentracija | Gibljivost | Morfologija |
|--|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| I + II | Spermanov koeficient korelacije | ,233* | ,201 | ,326** |
| | P vrednost (2-tailed) | ,037 | ,074 | ,004 |
| | N | 80 | 80 | 78 |
| III + IV | Spermanov koeficient korelacije | -,238* | -,208 | -,328** |
| | P vrednost (2-tailed) | ,033 | ,063 | ,003 |
| | N | 80 | 80 | 78 |
| I | Spermanov koeficient korelacije | ,321** | ,222* | ,529** |
| | P vrednost (2-tailed) | ,004 | ,048 | ,000 |
| | N | 80 | 80 | 78 |
| II | Spermanov koeficient korelacije | ,055 | ,111 | -,091 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,627 | ,326 | ,429 |
| | N | 80 | 80 | 78 |
| III | Spermanov koeficient korelacije | -,188 | -,138 | -,275* |
| | P vrednost (2-tailed) | ,095 | ,222 | ,015 |
| | N | 80 | 80 | 78 |
| IV | Spermanov koeficient korelacije | -,217 | -,225* | -,267* |
| | P vrednost. (2-tailed) | ,054 | ,044 | ,018 |
| | N | 80 | 80 | 78 |

*- statistično značilna razlika $P < 0.05$, Spermanov koeficient korelacije, **statistično pomembna razlika ($P < 0.01$), Spermanov koeficient korelacije

Izkazalo se je, da obstaja negativna statistična povezava med deležem "slabih" spermijev v semenu glede na vakuole (Razreda III + IV) ter koncentracijo in morfologijo spermijev (Preglednica 2).

Statistično značilno negativno povezavo smo opazili tudi med višjo starostjo moških in koncentracijo spermijev v semenu. Rezultati niso pokazali povezav med vakuolami v glavah spermijev in moškimi dejavniki kot so starost, višina, teža in indeks telesne mase (Preglednica 3).

Preglednica 3: Povezava med moškimi dejavniki (starost, višina, teža, ITM), klasičnimi parametri spermograma in vakuolami v glavah spermijev; Spearmanov koeficient korelacije, *Legenda:* ITM - indeks telesne mase, N - število vzorcev semena

| Razred spermijev glede na vakuole v glavah | | Starost | Višina | Teža | ITM |
|--|----------------------------------|---------|--------|-------|-------|
| I + II | Spearmanov koeficient korelacije | -,183 | -,009 | -,066 | -,098 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,124 | ,945 | ,595 | ,431 |
| | N | 72 | 67 | 67 | 67 |
| III + IV | Spearmanov koeficient korelacije | ,178 | ,003 | ,060 | ,095 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,135 | ,978 | ,632 | ,446 |
| | N | 72 | 67 | 67 | 67 |
| I | Spearmanov koeficient korelacije | -,150 | ,042 | -,022 | -,069 |
| | Sig. (2-tailed) | ,209 | ,733 | ,862 | ,578 |
| | N | 72 | 67 | 67 | 67 |
| II | Spearmanov koeficinet korelacije | -,038 | -,085 | -,071 | -,054 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,748 | ,496 | ,570 | ,663 |
| | N | 72 | 67 | 67 | 67 |
| III | Spearmanov koeficient korelacije | ,137 | ,045 | ,086 | ,095 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,250 | ,716 | ,488 | ,442 |
| | N | 72 | 67 | 67 | 67 |

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice3

| IV | Spermanov koeficient korelacije | ,036 | -,042 | -,073 | -,037 |
|---------------|---------------------------------|---------------|-------|-------|-------|
| | P vrednost (2-tailed) | ,762 | ,733 | ,558 | ,766 |
| | N | 72 | 67 | 67 | 67 |
| Koncentracija | Spermanov koeficient korelacija | -,246* | -,151 | -,100 | -,031 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,039 | ,225 | ,425 | ,807 |
| | N | 71 | 66 | 66 | 66 |
| Gibljivost | Spermanov koeficient korelacije | -,138 | -,116 | ,017 | ,078 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,250 | ,355 | ,890 | ,535 |
| | N | 71 | 66 | 66 | 66 |
| Morfologija | Spermanov koeficient korelacija | -,151 | -,154 | -,108 | -,027 |
| | P vrednost (2-tailed) | ,215 | ,226 | ,397 | ,832 |
| | N | 69 | 64 | 64 | 64 |

* statistično pomembna razlika ($P < 0.05$); Spermanov koeficient korelacije

4.1.3. Vakuole v glavah spermijev in izid postopka zunajtelesne oploditve

Povprečna starost žensk, vključenih v raziskavo, se ni razlikovala med skupinama (normozoospermija in teratozoospermija). Prav tako se skupini nista razlikovali po povprečnem številu jajčnih celic (Preglednica 4).

Uspešnost zanositve s semenom moških z normalno kakovostjo semena, kjer je bil uporabljen običajen postopek zunajtelesne oploditve (IVF), je bila 32,5 %. Pri semenu moških z teratozoospermijo, kjer so bile jajčne celice oplojene po metodi neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI), pa je bila uspešnost zanositve 26,8 % (Preglednica 4), kar kaže, da je slednja metoda primerna in uspešna za zdravljenje moške neplodnosti.

Preglednica 4: Izid postopka zunajtelesne oploditve (zanositev) glede na kakovost semena (normozoospermija, teratozoospermija), *Legenda:* IVF - klasična zunajtelesna oploditev; ICSI - neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice

| | Normozoospermija | Teratozoospermija |
|--|----------------------|----------------------|
| Število pacientov | 40 | 41 |
| Metoda oploditve | IVF | ICSI |
| Srednje število postopkov zunajtelesne oploditve | 2.0 (min.1 - max.5) | 1.2 (min.1 - max.6) |
| Srednja starost ženskih partneric (leta) | 34 (min.25 - max.43) | 34 (min.25 - max.42) |
| Srednje število jajčnih celic pri partnericah | 7.7 (min.1 - max.24) | 8.0 (min.1 - max.18) |
| Število nosečnosti | 13 | 11 |
| Stopnja zanositve na postopek (št. nosečnosti/postopek) | 32.5 % | 26.8 % |

Ni bilo statistično pomembnih razlik ($P < 0.05$) po testu hi-kvadrat

Nadaljna analiza podatkov je pokazala, da delež "dobrih" oziroma "slabih" spermijev glede na vakuole v glavah nakazuje uspešnost zanositve po postopku zunajtelesne oploditve, vendar je to odvisno od metode zunajtelesne oploditve.

Po klasični zunajtelesni oploditvi (IVF) z normalnimi vzorci semena smo opazili statistično pozitivno povezavo med deležem "dobrih" spermijev v vzorcu semena in deležem oplojenih jajčnih celic in negativno povezavo med deležem "slabih" spermijev v vzorcu semena in deležem oplojenih jajčnih celic (Preglednica 5).

Preglednica 5: Povezava med deležem "dobrih" spermijev (spermiji Razredov I + II) in "slabih" spermijev (spermiji Razredov III + IV) v vzorcih semena glede na vakuole v glavah spermijev in izidom postopka zunajtelesne oploditve (delež oplojenih jajčnih celic, delež blastocist) glede na metodo zunajtelesne oploditve. *Legenda:* IVF (N) - klasična zunajtelesna oploditev z normalnimi semenskimi vzorci; ICSI (T) - neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice z nenormalnimi semenskimi vzorci; Delež oplojenih jajčnih celic - število oplojenih jajčnih celic na število jajčnih celic; Delež blastocist - število blastocist na število zarodkov, N - število vzorcev semena.

| | | Razred I + II | Razred III + IV |
|--------------|----------------------|-----------------------|-----------------|
| Delež | oplojenih | Spermanov koeficient | |
| | korelacije | ,358* | -,358* |
| IVF | jajčnih celic | P vrednost(2-tailed) | ,041 |
| | | N | 33 |
| (N) | | Spermanov koeficient | |
| | korelacije | ,261 | -,261 |
| Delež | blastocist | P vrednost (2-tailed) | ,207 |
| | | N | 25 |
| | | Spermanov koeficient | |
| Delež | oplojenih | | -,050 |
| | korelacije | | ,048 |
| ICSI | jajčnih celic | P vrednost (2-tailed) | ,738 |
| | | N | 48 |
| (T) | | Spermanov koeficient | |
| | korelacije | -,041 | ,042 |
| Delež | blastocist | P vrednost (2-tailed) | ,809 |
| | | N | 37 |
| | | Spermanov koeficient | |
| | | | ,805 |
| | | | 37 |

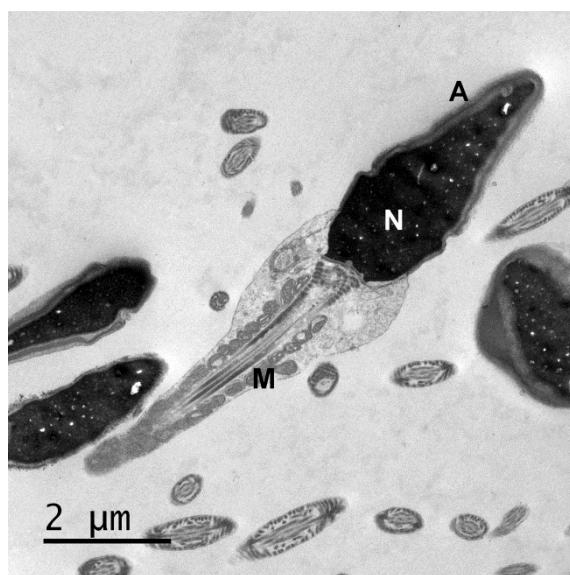
*statistično pomembna razlika ($P < 0.05$)

Nasprotno nismo opazili povezave med vakuolami v glavah spermijev slabega semena (teratozoospermija) in stopnjo oploditve po metodi neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI). Rezultati niso pokazali povezave med vakuolami v glavah spermijev in zanositvijo, ne glede na metodo zunajtelesne oploditve.

4.2. PRESEVNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)

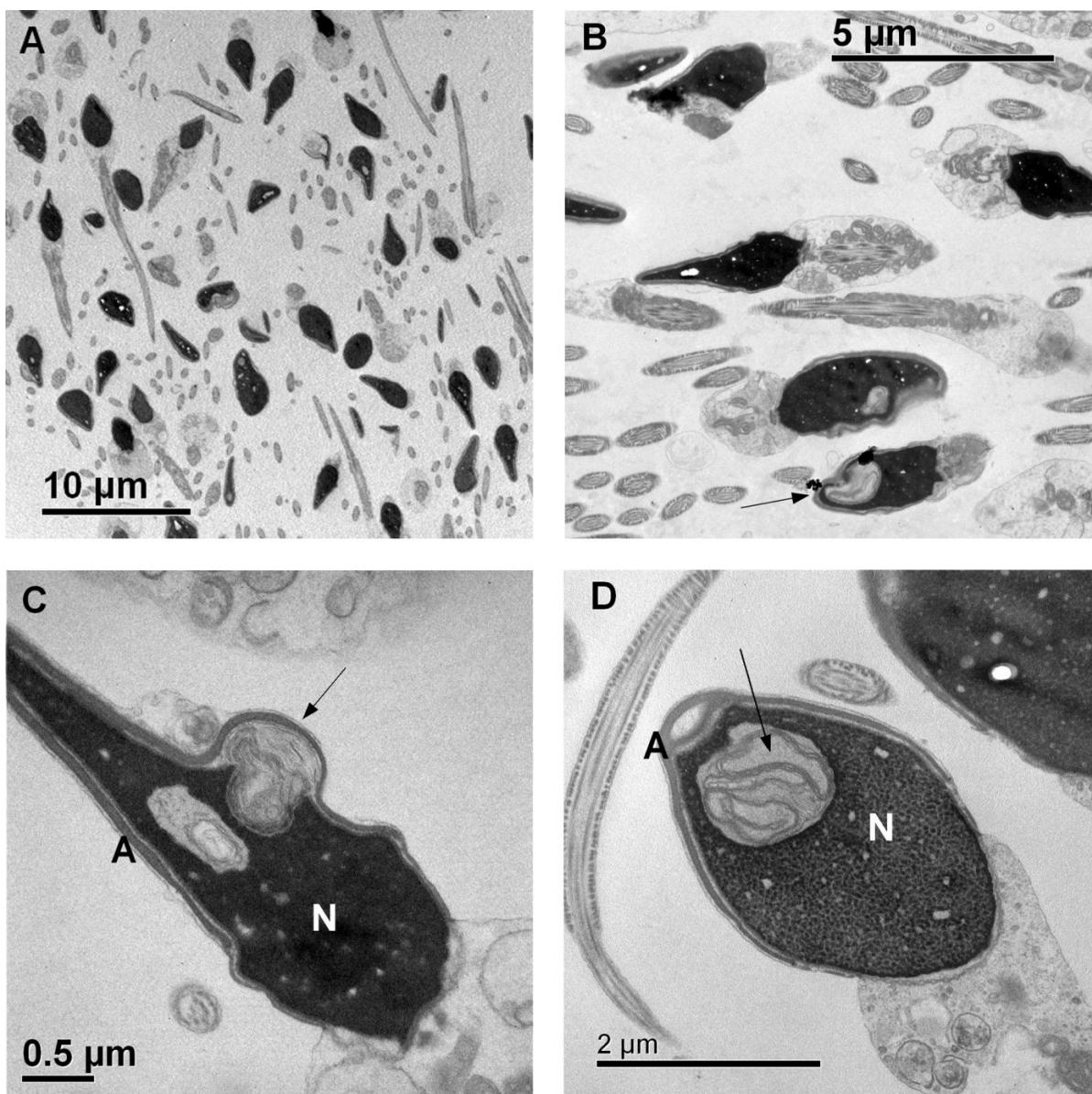
4.2.1. Ultrastrukturne značilnosti vakuol v glavah spermijev

S pomočjo presevne elektronske mikroskopije smo si ogledali običajne ultrastrukturne značilnosti spermijev (Slika 6).

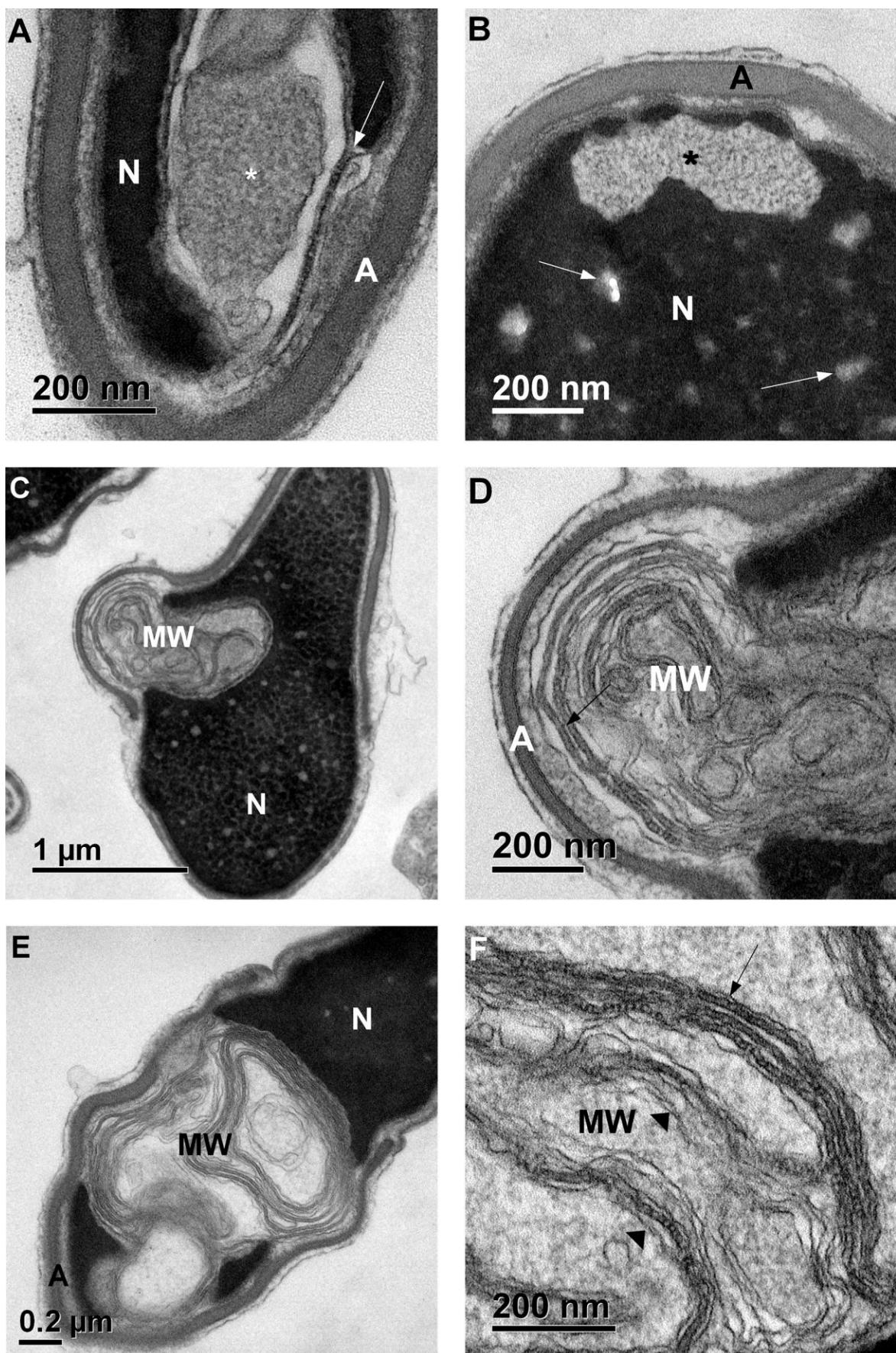


Slika 6: Elektronska mikrografija (TEM) normalnega spermija. Legenda : N - Jedro, A - Akrosom, M - Mitohondriji

Pogosto smo pri normalnih (N) in nenormalnih (T) vzorcih semena v predelu jedra opazili tudi vakuole (Slika 7B). Vakuole so bile prisotne v različnih področjih jedra in so lahko zavzemale velik del jedra (Slika 8E). Elektronske mikrografe so pokazale vakuole kot vdolbine jedra, ki so bile napolnjene z membranami (Slika 7C, 8C, D, E, F). Membrane so bile večinoma videti kot koncentrično urejeni "membranski svitki", ki so lahko zapolnjevali celotno vakuolo ali samo del vakuole. Membranski svitki so bili lahko močno kondenzirani in pogosto so bili obdani z nedotaknjenim akrosomom in plazmalemo ter so lahko izbočeno segali nad celično površino (Slika 7C, 8C, D). Zgrajeni so bili različno kompleksno, vendar so vedno vsebovali tesno prilegajoče dvojne membrane z elektronsko gostimi molekularnimi septami in tanke membrane, ki so obdajale kosmičast material (Slika 8D, F).

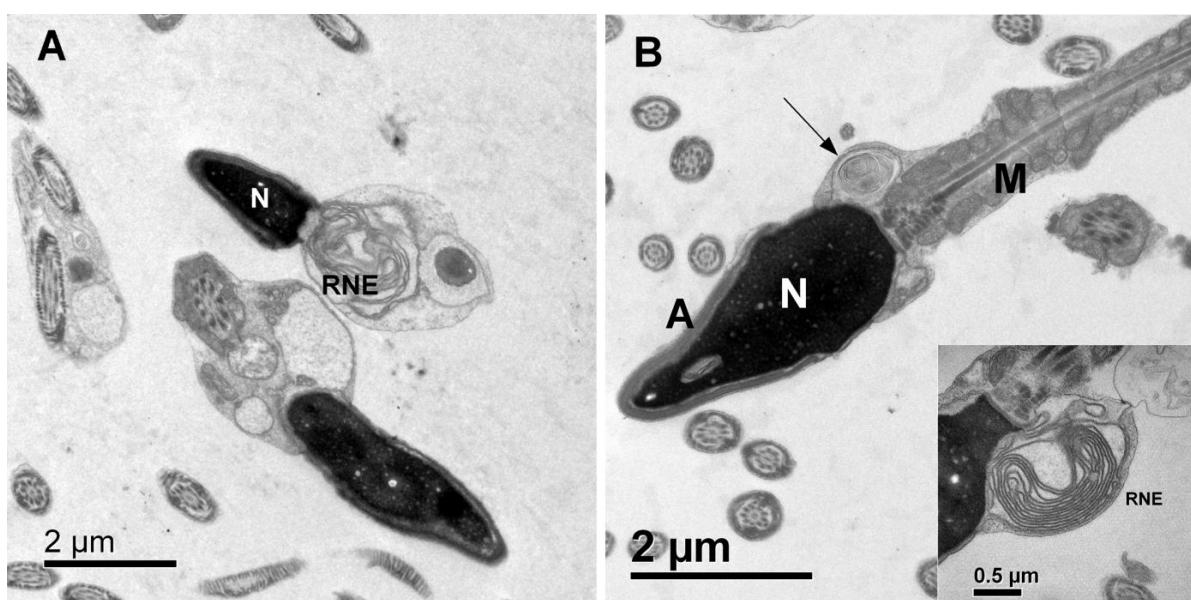


Slika 7: Elektronske mikrografije (TEM) normalnih vzorcev semena z vakuolami v glavah spermijev - različne velikosti in lege vakuol. B, D: apikalno, C: lateralno. Legenda : A - Akrosom, N - Jedro, M - Mitochondriji



Slika 8: Elektronske mikrografije (TEM) vakuol v glavah spermijev normalnih vzorcev semena (A, C, D, E, F) in nenormalnih vzorcev semena (teratozoospermija) (B). A: Jedne vdolbine z membranami, ki obdajajo kosmičast material (zvezdica). Dvojne membrane z molekularnimi septami (puščica) izhajajo iz jedrne ovojnice. B: Jedro s praznimi prostori, ki so mesta nekondenziranega kromatina (puščica) in večji predel s kosmičastim materialom (zvezdica). C: Membranski svitki so zgrajeni iz koncentrično urejenih membran. D: Večja povečava slike C. E: Membranski svitki zavzemajo velik del jedra. F: Velika povečava dvojnih membran s septalnimi kompleksi (puščica) in tankimi membranami (glava puščice). *Legenda :* A - Akrosom, N - Jedro, MW - Membranski svitki ali angl. membrane whorls.

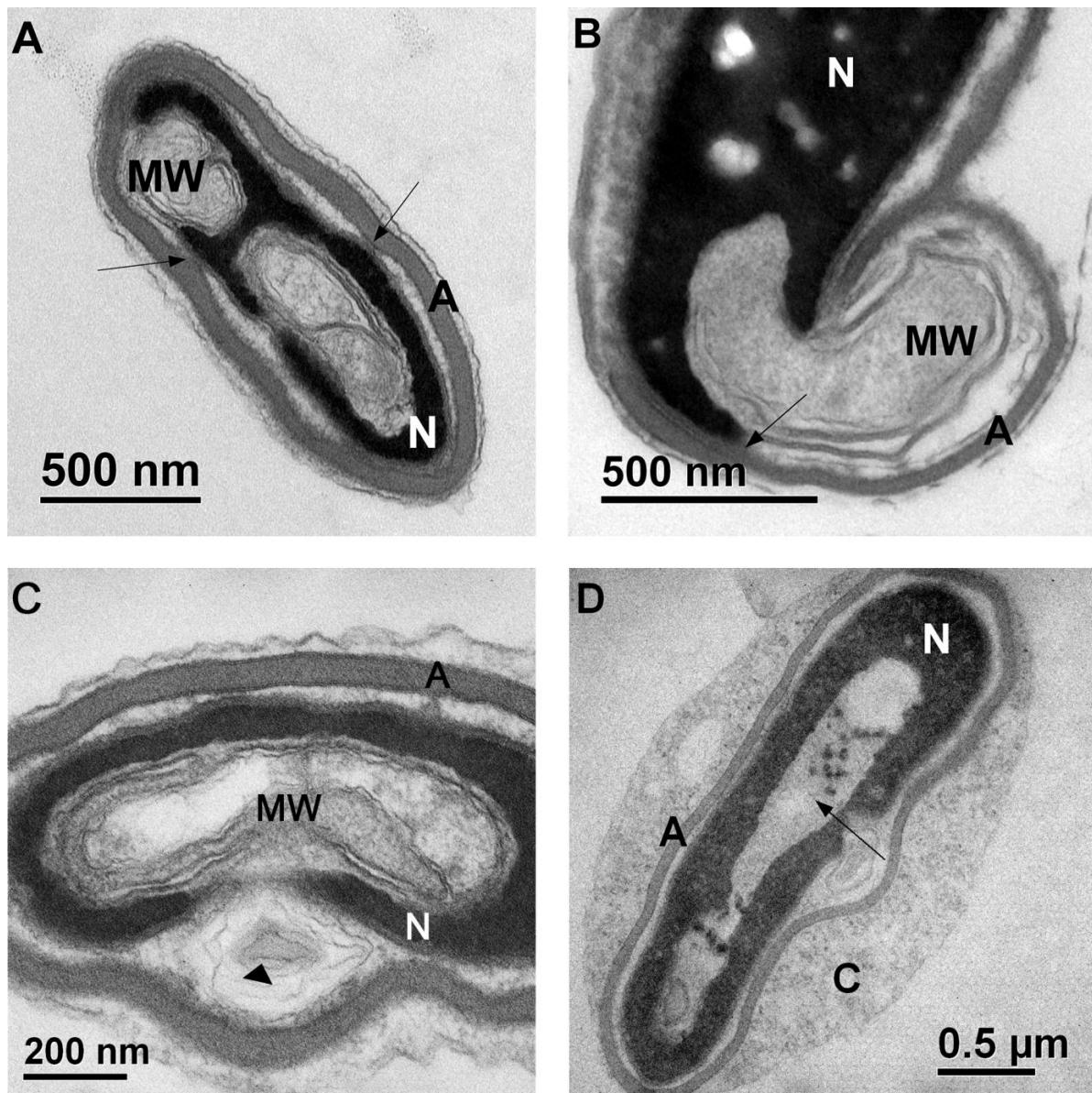
Membranske svitke smo opazili tudi v vratnem delu spermija izven jedra; ti skupki predstavljajo odvečno jedrno ovojnico (RNE ali angl.redundant nuclear envelope). Nastanejo v spremiogenezi, v času intenzivne kondenzacije kromatina ter preoblikovanja jedrne ovojnice (Slika 9).



Slika 9: Odvečna jedrna ovojnica v predelu vrata spermija (puščica). *Legenda :* N - Jedro, A - Akrosom, RNE-Odvečna jedrna ovojnica, M - Mitohondriji

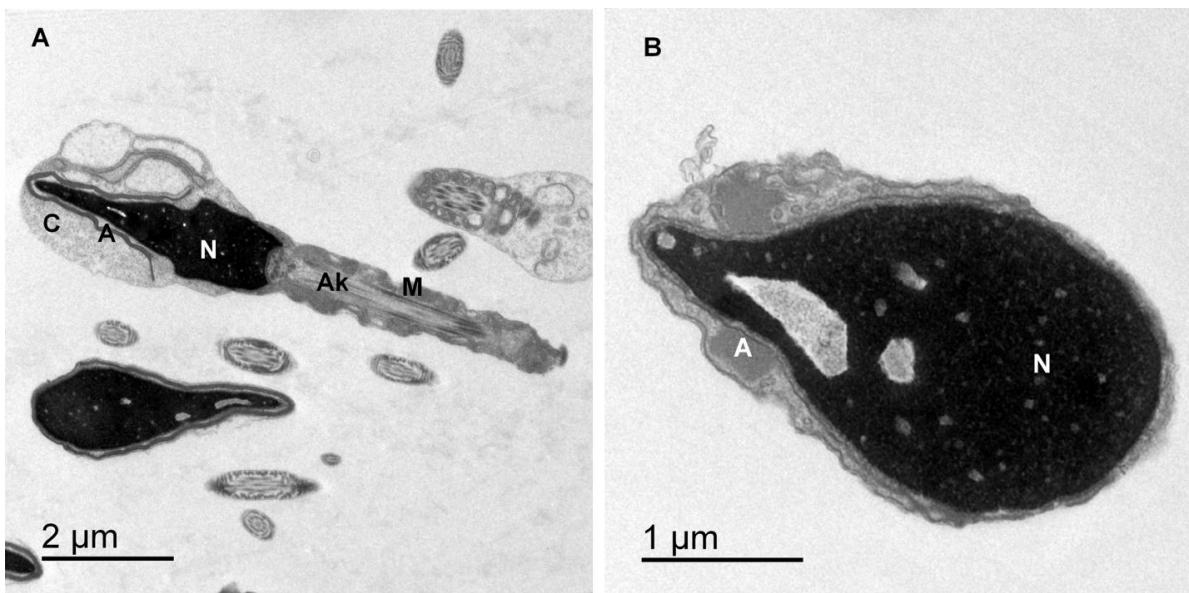
Med opazovanjem ultrastrukture semena smo poleg večjih vakuol ali membranskih svitkov opazili tudi manjša svetlejsa področja jedra, ki so bila prav tako obdana z membrano in napolnjena s kosmičastim materialom (Slika 8B). Poleg teh z membrano obdanih struktur so se občasno v jedrih pojavljala majhna elektronsko redka (zelo svetla) področja nepravilnih oblik, ki predstavljajo nekondenziran kromatin. Pogosto smo jih opazili skupaj

z membranskimi svitki (Slika 8C). Slabše kondenziran kromatin je bil v večjem obsegu prisoten pri nenormalnih vzorcih semena (teratozoospermija). Na Sliki 10D lahko vidimo spermij, kjer kondenzacija kromatina še poteka in jedro je še vedno obdano z večjo količino citoplazme, kar je znak nedokončane spermiogeneze. Citoplazma okoli jedra je vidna tudi na Sliki 11A.



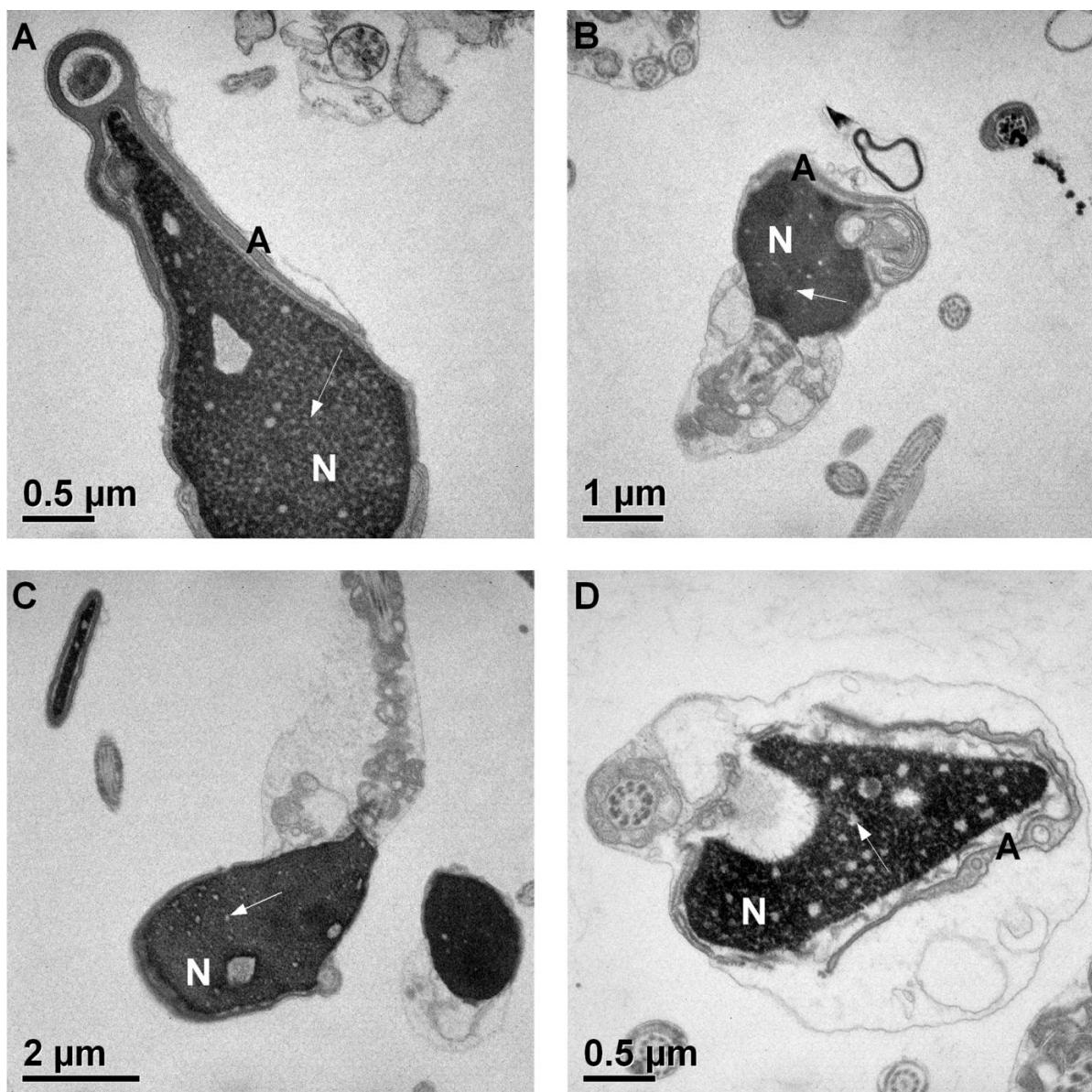
Slika 10: Prečni prerezi spermijev normalnih vzorcev (A, B, C) z večjimi vakuolami ali membranskimi svitki (angl. membrane whorls ali MW). A, B: Akrosomska membrana je v stiku z jedrno ovojnico (puščica). C: Membranski svitki z dodatnimi membranami med jedrom in akrosomom (glava puščice). D: Spermij z nenormalno morfologijo in večjim področjem nekondenziranega kromatina (puščica). Legenda : A - Akrosom, N - Jedro, C - Citoplazma, MW - Membranski svitki ali membrane whorls

Akrosom spermijev je bil pri večini pregledanih vzorcev normalno razvit in vakuole se niso nahajale v področju akrosoma. Kljub temu pa smo pri nekaterih spermijih opazili povezave med notranjo akrosomsko membrano in jedrno ovojnico (Sika 10A, B). Na Sliki 11 lahko vidimo nepravilno oblikovana akrosoma v nenormalnih vzorcih semena (teratozoospermija).



Slika 11: A: Nepravilno razvit akrosom in ostanki citoplazme okoli jedra. B: Nepravilno razvit akrosom in področja nekondenziranega kromatina v jedru. Legenda : N - Jedro, A - Akrosom, C - Citoplazma , M - Mitohondriji, Ak - Aksonema

Spermiji z nepravilno morfologijo so bili prisotni pri normalnih (N) in nenormalnih (T) vzorcih semena, vendar so bili pogosteje prisotni pri nenormalnih vzorcih. Opazili smo predvsem nepravilnosti v kondenzaciji kromatina, nenavadno oblikovan akrosom, povečan ali ukrivljen vrat, nepravilno oblikovane mitohondrije in nepravilen rep. Na Sliki 12 lahko vidimo nenormalne oblike oziroma morfologijo spermijev, ki pripadajo normalnim vzorcem semena – manj kondenziran kromatin, ukrivljen vrat, nenormalen akrosom in nenormalno oblikovane glave.



Slika 12: A, B, C, D : Spermiji normalnih (N) vzorcev semena z nepravilno morfologijo. Kromatin je granuliran in manj kondenziran s številnimi praznimi prostori (bele puščice). Akrosom je nepravilno razvit (A), delno razvit (D) in včasih povezan z membranskimi svitki (B). C: Ukrivljen vrat. Legenda : A - Akrosom, N - Jedro.

5. RAZPRAVA

Klinični pomen vakuol v glavah spermijev je še slabo poznan. Ultrastruktura vakuol v glavi človeških spermijev je še slabo raziskana in njihova funkcija nejasna. Večina dosedanjih raziskav vakuol v glavah človeških spermijev temelji na svetlobni mikroskopiji (DIC Nomarski), kjer so vakuole videti kot površinske ugreznitve. Elektronski posnetki so redki in njihova povezava s svetlobno mikroskopijo je nejasna. Poimenovanje vakuol je v literaturi raznoliko in temelji predvsem na svetlobni mikroskopiji. V okviru tega dela smo poskušali ugotoviti pojavnost vakuol v glavah spermijev glede na kakovost semena in dejavnike moškega, in njihov klinični pomen v postopku zunajtelesne oploditve. Vakuole v glavah spermijev so bile raziskovane tako s svetlobno kot elektronsko mikroskopijo.

5.1. SVETLOBNA MIKROSKOPIJA

5.1.1. Opazovanje vakuol z metodo MSOME

Pri skoraj vseh raziskavah vakuol v glavi spermijev se kot metoda raziskovanja uporablja svetlobna mikroskopija (DIC Nomarski, 6000X povečava), kjer so vakuole videti kot površinske ugreznitve. Vakuole so pogosto opisane kot "žepkaste ugreznitve jedra" (Boitrelle in sod., 2013) ali "prstni odtisi" (Boitrelle in sod., 2011), kar smo opazili tudi v okviru tega dela (Slika 5). Kljub temu pa moramo upoštevati, da so omenjene svetlobne mikrografije rezultat diferencialne kontrastne mikroskopije, kjer zaradi loma svetlobe, ki potuje skozi različno debele in optično goste predele vzorca, nastane psevdo - tridimenzionalna slika. Videz površinskih ugreznitev svetlobne mikroskopije je mogoče pojasniti z razumevanjem delovanja DIC svetlobnega mikroskopa in natančne ultrastrukturne zgradbe vakuol. S pomočjo elektronske mikroskopije smo opazili, da so vakuole v glavah spermijev napolnjene z membranami ali membranskimi svitki, ki so pokriti s plazmalemo in akrosomom. Včasih so membranski svitki izrazito izbočeni nad celično površino. Membrane, ki so naložene v vdolbinu jedra, močneje prepuščajo svetlubo v primerjavi z optično gostejšim jedrom in videti je, kot da je ugreznjena celotna površina celice, čeprav je ugreznjeno le jedro.

Naše elektronske mikrografije kažejo, da so vakuole le ugreznitve jedra, kar se ujema z delom Boitrelle s sod., (2011) , ki so s pomočjo tehnike barvanja DNA pokazali, da gre v primeru vakuol za jedrne vdolbine.

5.1.2. Pojav vakuol v semenu normalne in nenormalne kakovosti (MSOME), klasični parametri spermograma in moški dejavniki

Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvijo, da seme moških z normalnim spermogramom vsebuje več spermijev brez vakuol ali z majhnimi vakuolami v glavah (Boitrelle in sod., 2013) in da so vakuole bolj pogoste v vzorcih semena moških s slabo morfologijo spermijev - teratozoospermijo (Skowronek in sod., 2010). Kljub temu, da so vakuole v literaturi opisane kot degenerativne strukture, povezane z moško neplodnostjo (Boitrelle in sod., 2011; Bartoov in sod., 2003; DeVos in sod., 2013), so naši rezultati pokazali, da se vakuole v glavah spermijev pojavljajo tako v normalnih (N) kot nenormalnih (T) vzorcih semena, kar pomeni, da niso le značilnost semena slabe kakovosti in jih ne moremo istovetiti le s patološkim stanjem (Preglednica 1).

Naše rezultati prav tako ne nasprotujejo razmišljanju, da so vakuole del normalne morfologije spermija (Wantabe in sod., 2011; Tanaka in sod., 2012), saj so se v obeh tipih vzorcev podobno pogosto pojavljali spermiji z eno ali dvema majhnima vakuolama v glavah (Preglednica 1). Kljub vsemu so se normalni (N) in nenormalni (T) vzorci semena statistično pomembno razlikovali v deležu spermijev Razreda III (več malih ali ena velika vakuola). Spermiji z veliko ali več malih vakuol v glavah so bili bolj pogosti v nenormalnih vzorcih semena (T), kar pomeni, da bi lahko velike vakuole predstavljale patološko stanje (Preglednica 1).

Izkazalo se je, da obstaja negativna povezava med deležem "slabih" spermijev v vzorcih semena glede na vakuole v glavah (spermiji Razreda III in IV) in koncentracijo ozioroma morfologijo spermijev (Preglednica 2), kar kaže na to, da so številne majhne vakuole in velike vakuole značilnost semena slabe kakovosti. Slednje je pokazal tudi Perdix s sod., (2012).

Dosedanje študije so pokazale, da nekateri moški dejavniki lahko vplivajo na kakovost semena in prisotnost oziroma velikost vakuol v glavah spermijev (Levit s sod., 2005, Silva s sod., 2012, Wogatzky s sod., 2012). Ena izmed raziskav je pokazala, da višja starost moškega in višji indeks telesne mase (ITM) vplivata na povečan pojav vakuol v glavah spermijev, vendar se to lahko izniči s pogostejšo ejakulacijo in krajšo spolno abstinenco moških (Wogatzky s sod. 2012). V okviru tega dela nismo opazili povezav med vakuolami v glavah spermijev in moškimi dejavniki (starost, teža, višina in ITM, Preglednica 3). Analiza naših podatkov je pokazala le statistično negativno povezavo med starostjo moških in koncentracijo spermijev v vzorcih semena, kar nakazuje, da se s starostjo moškega manjša koncentracija spermijev v semenskem izlivu.

5.1.3. Vakuole v glavah spermijev in izid postopka zunajtelesne oploditve (IVF, ICSI)

Pri normalnih vzorcih semena (N), kjer je bila uporabljenha klasična metoda zunajtelesne oploditve (IVF), in pri nenormalnih vzorcih semena (T), kjer je bil uporabljen postopek ICSI, je bila stopnja zanositve podobna. Po metodi klasične zunajtelesne oploditve (IVF) je bil delež oplojenih jajčnih celic statistično pomembno manjši po oploditvi s "slabimi" spermiji Razredov III in IV (velike vakuole), kar kaže na to, da velike vakuole negativno vplivajo na oploditev po omenjeni metodi. Kljub temu pa nismo opazili značilnih povezav med pojavom vakuol in izidom zunajtelesne oploditve po metodi ICSI, kot so pokazale prejšnje študije (Berkovitz s sod., 2006, Vanderzwalmen s sod., 2008, Knez s sod., 2011). Prav tako nismo opazili povezave med vakuolami v glavah spermijev v vzorcih semena obeh tipov in zanositvijo v postopku zunajtelesne oploditve, tako po IVF kot ICSI.

5.2. ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Elektronske mikrografije vakuol spermijev so v literaturi redko predstavljene in njihova ultrastruktura ni jasno opisana (Chemez in sod., 2012, Sathanthan in sod., 2013). Na mikrografijah so večji svetlejši predeli običajno predstavljeni kot vakuole in manjši svetlejši predeli niso označeni.

5.2.1. Ultrastrukturne značilnosti vakuol

Naše mikrografije so pokazale, da so vakuole vdolbine v področju jedra, ki vsebujejo skladovnice membran (Slika 7C, 8C). Membrane so urejene kot koncentrične lamele ali membranski svitki (angl. membrane whorls), ki so včasih izbočeni nad celično površino. Membranski svitki so različno kompleksni in so običajno zgrajeni iz debelejših, tesno prilegajočih dvojnih membran z elektronsko gostimi molekularnimi septami in notranjih tankih membran, ki obdajajo neznan kosmičast material. Pokriti so z razvitim akrosomom in plazmalemo (Slika 8C, D). Franklin s sod. (1972) je membranske svitke, ki so bile v stiku z jedrno ovojnico, opazil v apikalnem subakrosomalnem delu poznih spermatid pri hrčku. Avtorji so ugotovili, da so v zadnjih stopnjah spermogeneze postali membranski svitki večji in številnejši.

Med zorenjem spermijev (spermogenezo) se jedrna ovojnica, dinamična membranska struktura okoli jedra zmanjšuje (Garnier Lhomme in sod., 2009). Mnogo podrobnosti preoblikovanja ovojnice ostaja neznanih. Naše mikrografije membranskih svitkov so pokazale, da so le-ti včasih povezani z notranjo membrano jedrne ovojnice (Slika 10A, B), zato bi membrane vakuol lahko izvirale iz jedrne ovojnice.

Številni avtorji so pokazali, da se na bazi glave spermija med razvojem "naloži" odvečna jedrna ovojnica (angl. redundant nuclear envelope ali RNE) (Haraguchi in sod., 2007; Garnier Lhomme in sod., 2009 in Ho in sod., 2003) in tudi na naših posnetkih smo jo opazili (Slika 9A, B).

V zadnjih fazah spermogeneze nukleoproteini protamini nadomestijo nukleoproteine histone in DNA postane močno kondenzirana (Haraguchi in sod., 2007). Zelo pogosto prihaja do napak v kondenzaciji kromatina in nastanka nepravilno oblikovanih "praznih prostorov", ki so lahko različno veliki in številčni.

Nepravilna kondenzacija je lahko tudi značilnost spermijev z majhnimi ali velikimi vakuolami (Boitrelle in sod., 2011, 2013). Naše mikrografije so pokazale manjša, elektronsko redkejša področja ne-kondenziranega kromatina, ki se razlikujejo od večjih

membranskih svitkov (Slika 8B, C) in pogosteje smo jih opazili pri semenskih vzorcih teratozoospermije. Slabše kondenziran kromatin smo pogosteje opazili skupaj z vakuolami, zato bi bile slednje lahko povezane s procesom kondenzacije kromatina, vendar so za potrditev razmišljanja potrebne bolj natančne raziskave.

Kakor je v svojem delu povzela Setti s sod., (2013), nekateri avtorji menijo, da so vakuole akrosomskega izvora (Kacem in sod., 2010) in so povezane z nereaktivnim akrosomom (Montjean in sod., 2012). Naše elektronske mikrografije so pokazale, da so vakuole samostojne strukture, vendar so bile membrane vakuol občasno povezane z zunanjimembrano jedra in notranjo ovojnico akrosoma.

Med procesom spermiogeneze se membranske strukture spermija dinamično preoblikujejo in na podlagi našega dela ne moremo z gotovostjo govoriti o izvoru membranskih svitkov ali vakuol. Menimo, da bi le-ti lahko bili del jedrne ovojnice s kompleksi por, ki se med preoblikovanjem jedra postopno razgrajujejo.

Funkcija vakuol tako še vedno ostaja neznana. Membranski svitki bi lahko bili proteolitični centri, kamor se odlagajo odvečni nukleoproteini (med kondenzacijo kromatina se bazični histoni nadomestijo s kislimi protamini). Prestavljal bi lahko skladišče odvečnih nukleoproteinov in mesto, kjer se shranjujejo encimi, potrebni za razgradnjo nukleoproteinov. Vsekakor so za potrditev razmišljanja potrebne bolj natančne raziskave.

6. SKLEPI

V magistrski nalogi smo si želeli ogledati ultrastrukturo vakuol v glavi spermijev, pridobljenih v postopku zunajtelesne oploditve in bolje razumeti njihov pomen v humani reprodukciji.

Naše ugotovitve :

- S svetlobnim mikroskopom (DIC Nomarski, >6000X povečava) smo opazili dva različna tipa vakuol v vzorcih semena normalne (N) in nenormalne (T) kakovosti: vakuole, ki imajo videz površinskih vdolbin in manjša, svetla znotrajcelična področja.
- Vakuole v glavah spermijev se pojavljajo v vzorcih semena z normalno in nenormalno kakovostjo. Velike vakuole ali vakuole v večjem številu se pogosteje pojavljajo v semenu s slabšo koncentracijo in morfologijo spermijev.
- Moški dejavniki, kot so starost, višina, teža in indeks telesne mase niso povezani s pojavljanjem vakuol v glavah spermijev, vendar se s starostjo moškega manjša koncentracija spermijev v semenu.
- Velike vakuole v glavah spermijev negativno vplivajo na delež oplojenih jajčnih celic po metodi klasične zunajtelesne oploditve (IVF) z normalnimi vzorci semena, ne pa po metodi neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI) z nenormalnimi vzorci semena. Vakuole v glavah spermijev ne vplivajo na zanositev v postopku zunajtelesne oploditve.
- Elektronske mikrografije so potrdile, da se vakuole pojavljajo izključno v jedru in ne v predelu akrosoma spermijev.
- Izkazalo se je, da vakuole niso površinske ugreznitve membrane spermija, temveč jedrne ugreznitve, napolnjene z membranami in obdane z jedrno ovojnico, akrosomom in plazmalemo.
- Na ultrastrukturnem nivoju so vakuole videti kot jedrne vdolbine, napolnjene s koncentrično urejenimi membranami. Membrane imajo videz membranskih svitkov, ki so zgrajeni iz debelejših enakomerno septiranih membran in tankih

membran, ki obdajajo kosmičast material. Membranski svitki se včasih dotikajo notranje membrane jedrne ovojnice.

- Skupaj z vakuolami smo na ultrastrukturnem nivoju v jedru pogosto opazili predele s slabše kondenziranim kromatinom.

7. POVZETEK

V raziskavi smo uporabili semenski izliv 81 moških, vključenih v program zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki, Univerzitetni klinični center Ljubljana, od tega 40 moških z normalno kakovostjo semena (normozoospermijo) in 41 moških z nenormalno morfologijo spermijev v semenu (teratozoospermijo). Ejakulirano, sveže seme smo pripravili po opisanem postopku (Knez, 2009) tako, da smo iz vzorca pridobili najbolj kakovostne spermije za oploditev. Pripravljeno seme je bilo uporabljeni za zunajtelesno oploditev jajčnih celic partnerice. Vzorci semena normalne kakovosti so bili uporabljeni za zunajtelesno oploditev z običajno metodo zunajtelesne oploditve (*in vitro* fertilization-IVF; inseminacija jajčnih celic), seme nenormalne kakovosti pa z metodo neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (intracytoplasmic sperm injection - ICSI). Preostanek semena oziroma spermijev, ki niso bili uporabljeni za zunajtelesno oploditev, smo s pomočjo metode MSOME (angl. motile sperm organelle morphology examination) pregledali s svetlobnim mikroskopom (DIC Nomarski) pri povečavi približno 6000x in ugotavliali prisotnost vakuol v glavah spermijev. Analizirali smo 40 vzorcev semena normalne kakovosti (N) in 41 vzorcev semena slabe kakovosti – s poslabšano morfologijo spermijev (T; teratozoospermija) tako, da smo 200 spermijev vsakega vzorca pregledali in opisali prisotnost vakuol v glavah. Spermije smo razdelili v štiri razrede glede na prisotnost, velikost in število vakuol v glavah (klasifikacija po Vanderzwalmen s sod., 2008): Razred I (brez vakuol), Razred II (največ dve mali vakuoli), Razred III (več kot dve mali vakuoli ali ena velika vakuola), Razred IV (več velikih vakuol). Spermije posameznih razredov smo med seboj primerjali med vzorci normalne (N) kakovosti in vzorci nenormalne kakovosti (T) in ugotovili, da so vakuole v glavah spermijev značilnost tako vzorcev semena z normalno (N) kot poslabšano kakovostjo (T), vendar se pri slednjih vakuole pojavljajo pogosteje. Izkazalo se je, da se velike vakuole ali številčnejše vakuole v glavah spermijev pojavljajo v semenu nenormalne kakovosti s poslabšano morfologijo spermijev (teratozoospermijo) in negativno vplivajo na delež oplojenih jajčnih celic po metodi klasične zunajtelesne oploditve (IVF). Statistična obdelava podatkov je pokazala, da moški dejavniki, kot so starost, višina, teža in indeks telesne mase (ITM) ne vplivajo na pojav vakuol v glavah spermijev, vendar se s starostjo moškega manjša koncentracija spermijev v semenu.

Del semenskega vzorca, ki je ostal po pregledu z metodo MSOME, smo isti dan fiksirali in pripravili za presevno elektronsko mikroskopijo. Osredotočili smo se na opis ultrastrukture vakuol, kondenzacijo kromatina, videz in razvitost akrosoma ter splošno obliko spermija. Mikrografije so pokazale, da se vakuole v glavah spermijev pojavljajo izključno v povezavi z jedrom in so videti kot jedrne vdolbine ali izbokline, napolnjene s skladovnicami membran. Membrane vakuol so bile urejene v koncentrične lamele ali membranske svitke, ki so bili včasih izbočeni nad celično površino. Membranski svitki so bili običajno zgrajeni iz debelejših, tesno prilegajočih dvojnih membran z elektronsko gostimi molekularnimi septami, ki so spominjali na jedrne pore in notranjih tankih membran, ki so obdajali kosmičast material. Pokriti so bili z normalno razvitim akrosomom in plazmalemo ter včasih v stiku z notranjo membrano jedrne ovojnice, zato menimo, da membrane vakuol lahko izvirajo iz jedrne ovojnice. V istih spermalnih celicah smo pogosto opazili manjša, elektronsko redka področja slabše kondenziranega kromatina. Včasih smo opazili tudi večja elektronsko redkejša področja, zapolnjena z neznanim materialom, ki ni vseboval membran. Po pregledu številnih elektronskih mikrografij spermijev menimo, da se slabša kondenzacija kromatina, skupaj z membranskimi svitki ali vakuolami pogosteje pojavlja pri nenormalnih vzorcih semena s slabo morfologijo spermijev (teratozoospermijo). Slabša kondenzacija kromatina skupaj z vakuolami, bi lahko bila povezana z nepravilnim razvojem spermijev, vendar so za razumevanje potrebne natančnejše raziskave.

8. REFERENCE

- Alvarez Sedo C., Rawe V.Y., Chemes H.E. 2012. Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Human Reproduction*, 27, 7: 1912-210
- Bartoov B., Berkovitz A., Eltes F., Kogosovsky A., Yagoda A., Lederman H., Artzi S., Gross M., Barak Y. 2003. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertility Sterility*, 80, 6: 1413-1419.
- Berkovitz A., Eltes F., Ellenbogen A., Peer S., Feldberg D., Bartoov B. 2006. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affects pregnancy outcome ? *Human Reproduction*, 21, 7: 1787-1790
- Boitrelle F., Ferfouri F., Petit J.M., Segretain D., Tourain C., Bergere M., Bailly M., Vialard F., Albert M., Selva J. 2011. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Human Reproduction*, 26: 1650–1658
- Boitrelle F., Albert M., Petit J.M., Ferfouri F., Wainer R., Bailly M., Vialard F., Selva J. 2013. Small human sperm vacuoles observed under high magnification are pocket-like nuclear concavities linked to chromatin condensation failure. *Reprod BioMed online*, 27: 2: 201-211
- Chemes H.E., Cristian Alvarez Sedo C.A. 2012. Tales of the tail and sperm head aches: Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian Journal of Andrology*, 14: 14–23
- Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H.W., Behre H.M., Haugen T.B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M.T., Vogelsong K.M.. 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16: 3: 231-245
- De Vos A., Van de Velde H., Bocken G., Eylenbosch G., Franceus N., Meersdom G., Tistaert S., Vankelecom A., Tournaye H., Verheyen G. 2013. Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. *Human Reproduction*, 28: 3: 617-626

- Enginsu M.E., Dumoulin J.C., Pieters M.H., Bras M., Evers J.L., Geraeds J.O. 1991. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining : correlation of morphology with fertilization in vitro. *Human Reproduction*, 6: 854-858
- Escalier D. 1990. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *International Journal of Developmental Biology*, 3: 287-297
- Fawcett D.W. A textbook of histology. Bloom. 1986. Bloom W, Fawcett DW (ur.). 1986. Philadelphia ,W.B. Saunders Company: 796-826
- Franco J.G., Baruffi R.L.R., Mauri A.L., Petersen C.G., Oliveira J.B.A., Vagnini L. 2008. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*, 17: 42-45
- Franklin L.E., Fussell E.N. 1972. Evolution of the Apical Body in Golden Hamster Spermatids With Some Reference to Primates. *Biology of reproduction* 7: 194-206
- Garnier-Lhomme M., Byrne R.D., Hobday T.M.C., Gschmeissner S., Woscholski R., Poccia D.L., Dufourc E.J., Larijani B. 2009. Nuclear Envelope Remnants: Fluid Membranes Enriched in STEROLS and Polyphosphoinositides. *PloS ONE*, 4, 1: 4255
- Gatimel N., Leandri R.D., Foliguet B., Bujan L., Parinaud J. 2012. Sperm cephalic vacuoles: new arguments for their non acrosomal origin in two cases of total globozoospermia. *Andrology*, 1: 52-56
- Haraguchi C.M., Mabuchi T., Hirata S., Shoda T., Tokumoto T., Hoshi H., Yokota S. 2007. Possible Function of Caudal Nuclear Pocket: Degradation of Nucleoproteins by Ubiquitin-Proteasome System in Rat Spermatids and Human Sperm. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55, 6: 585-595
- Ho H.C., Suarez S.S. 2003. Characterization of the Intracellular Calcium Store at the Base of the Sperm Flagellum That Regulates Hyperactivated Motility. *Biology of Reproduction*, 68: 1590-1596
- Johnson G.D., Lalancette C., Linnemann A.K., Leduc F., Boissonneault G., Krawetz S.A. 2011. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*, 141: 21-36

- Kacem O., Sifer C., Barraud-Lange V., Ducot B., De Ziegler D., Poirot C., Wolf J. 2010. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reproduction Biomed Online*, 20: 132–137
- Knez K., Zorn B., Tomazevic T., Vrtacnik-Bokal E., Virant-Klun I. 2011. The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: A comparative prospective randomized study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 123 str.- /? knjiga – urednik, kraj založbe, založba, obseg strani/
- Knez K. 2009. Vpliv morfologije spermijev na izid postopka neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI) v programu zunajcelične oploditve. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Diplomska naloga, 69 str.
- Levitas E., Lunenfeld E., Weiss N., Friger M., Har-Vardi I., Koifman A., Potashnik G. 2005. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertility Sterility*, 83, 6: 1680-1686.
- Mescher A.L(ur.). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 2010. 12th ed. New York, United States of America, The McGraw Hill companies: 467 str.
- Montjean D., Belloc S., Benkhalifa M., Dalleac A., Menezo Y. 2012. Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. *Human Reproduction*, 27 : 2927–2932
- Perdrix A., Travers A., Chelli M.H., Escalier D., Do Rego J.L., Milazzo J.P., Mousset-Simeon N., Mace B., Rives N. 2011. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Human Reproduction*, 26: 47–58
- Perdrix A., Saïdi R., Ménard J.F., Gruel E., Milazzo J.P., Macé B., Rives N. 2012. Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *International Journal of Andrology*, 35, 4: 491-508
- Sathananthan A.H. 2013. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: A personal survey. *Micron*, 44: 1-20
- Setti A.S., Ferreira Braga D.P.A., Ilaconelli A., Aoki T., Borges E. 2013. Twelve years of MSOME and IMSI : a review. *Reproductive BioMedicine online*, 27: 338-352
- Silva L.F., Oliveira J.B., Petersen C.G., Mauri A.L., Massaro F.C., Cavagna M., Baruffi R.L., Franco J.G. 2012. The effects of male age on sperm analysis by motile sperm

organelle morphology examination (MSOME). Journal of Reproductive Biology and Endocrinology, 10: 19

Tanaka A., Nagayoshi M., Tanaka I., Kusunoki H. 2012. Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process. Fertil Sterility, 98: 315–320

Vanderzwalmen P., Hiemer A., Rubner P., Magnus B., Neyer A., Secher A., Uher P., Zintz M., Lejeune B., Vanderzwalmen S., Cassuto G., Zech N.H. 2008. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of vacuoles. Reproductive BioMedicine Online 17, 15: 617-627

Virant- Klun I., Meden-Vrtovec H., 2002a. Od nastanka gamet do rojstva : oploditev z biomedicinsko pomočjo: teoretični in slikovni prikaz nastanka gamet, zgradbe gamet in tehnik oploditve z biomedicinsko pomočjo. Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomaževič T.(ur.). Radovljica, Didakta: 255 str.

Watanabe S., Tanaka A., Fujii S., Mizunuma H., Fukui A., Fukuwara R., Nakamura R., Yamada K., Tanaka I., Awata S. 2011. An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay. Human Reproduction, 26: 978-986

Wogatzky J., Wirleitner B., Stecher A., Vanderzwalmen P., Neyer A., Spitzer D., Schuff M., Schechinger B., Zech N.H. 2012. The combination matters--distinct impact of lifestyle factors on sperm quality: a study on semen analysis of 1683 patients according to MSOME criteria. Reproductive Biology and Endocrinology, 10: 115.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010, 5th edition. Geneva, Switzerland, World Health Organization: 271 str.

http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf (20. april. 2014)

ZAHVALA

Draga dr. prof Irma Viran-Klun, mentorica in vzornica, hvala, da ste me popeljali v svet reproduktivne medicine, zares sem uživala. Neskončno hvala za nesebično pomoč in vodstvo.

Draga dr. prof. Jasna Štrus, somentorica in najljubša profesorica, hvala za predanost in Vaš čas. Hvala za znanje in hvala, da ste me že v 1. letniku dodiplomskega študija popolnoma navdušili nad biologijo.

Draga dr. Magda Tušek Žnidarič, prijateljica in učiteljica, neskončno se Vam zahvaljujem za prijaznost, potrežljivost in pomoč. Hvala za družbo in vse popite kavice. Hvala, da ste mi tako prijetno prikazali svet elektronske mikroskopije.

Draga Mami, najboljša prijateljica in sopotnica; HVALA, da si me naučila kako pomembno je svoj čas nameniti stvarem, ki te najbolj veselijo. Hvala, da si me naučila, kako biti srečna. In hvala za vse trenutke, ki sva jih in jih še bova preživeli skupaj. Kakšna sreča, da imam najboljšo Mami !

Dragi Thibault, moja ljubezen in najboljši prijatelj, hvala, da me vedno spominjaš na najpomembnejše stvari v življenju in hvala za večni optimizem. Hvala za naju. Ti si moj mali žabi.

Dragi Boris, najljubši stric in prijatelj, hvala, da sem med študijem lahko prebivala v tako prijetni sobi.

Dragi Janez, soplesalec in prijatelj, hvala za odlično družbo in vsa kosila. Hvala, da me še vedno "prenašaš".

Draga Sara, nekrvna sestra in večna prijateljica, hvala za vse dogodivščine in popite kozarčke. Vesela sem, da sva odrasli skupaj !

Dragi Tadej, sošolec in prijatelj, hvala za vedno zanimive pogovore in ideje.

Draga Maja, Asim (Sunshine), Anemari in Vesna, hvala za vsa kosila in dneve polne smeha. Brez vas bi bila leta študija prazna.