

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Kaja FERK

**DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV PO OPLODITVI S
SPERMIJI IZ TESTISA IN EJAKULATA V PROGRAMU
ZUNAJTELESNE OPLODITVE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Kaja FERK

**DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV PO OPLODITVI S SPERMIJI IZ TESTISA IN
EJAKULATA V PROGRAMU ZUNAJTELESNE OPLODITVE**

MAGISTRSKO DELO
Univerzitetni študij – 2. stopnja

**DEVELOPMENTAL DYNAMICS OF EMBRYOS AFTER FERTILIZATION WITH
SPERMATOOZOA FROM TESTES AND SEMEN IN THE IN VITRO
FERTILIZATION PROGRAMME**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje – Molekulska in funkcionalna biologija. Delo je bilo opravljeno na Kliničnem oddelku za reprodukcijo Ginekološke klinike, Univerzitetni klinični center Ljubljana.

Študijska komisija študija Molekulske in funkcionalne biologije je za mentorico diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Irmo Virant – Klun in za recenzentko prof. dr. Lilijano Bizjak Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Petra GOLJA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Irma VIRANT – KLUN

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Članica: prof. dr. Lilijana BIZJAK MALI

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Kaja Ferk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 616.697(043.2)
KG neplodnost/ICSI/time-lapse/TESE/OAT/azoospermija/
oligoastenoteratozoospermija
AV FERK, Kaja, dipl. bioteh. (UN)
SA VIRANT – KLUN, Irma (mentorica)/BIZJAK MALI, Lilijana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI 2016
IN DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV PO OPLODITVI S SPERMIJI IZ TESTISA IN EJAKULATA V PROGRAMU ZUNAJTELESNE OPLODITVE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XIII, 74 str., 16 pregl., 24 sl., 1 pril., 35 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kadar neplodni moški v ejakulatu nimajo spermijev (azoospermija), androlog pridobi nezrele spermije iz testisov (redkeje nadmodka) z biopsijo ali aspiracijo. V raziskavi smo z mikroskopijo v časovnih presledkih (time-lapse) spremljali razvoj zarodkov po oploditvi s spermiji slabe kakovosti (malo spermijev, slabo gibljivi spermiji, spermiji s slabo morfologijo) iz ejakulata (oligoastenoteratozoospermija) in po oploditvi s spermiji, izoliranimi iz testisov (azospermija). Zanimal nas je vpliv izvora in zrelosti spermijev na dinamiko razvoja in kakovost zarodkov v postopku zunajtelesne oploditve, pri parih s težko obliko moške neplodnosti. Razvoj zarodka v predimplantacijski dobi je kompleksen proces, ki vključuje natančno odvijanje dogodkov. Time-lapse mikroskopija je idealno novo orodje za študij dinamike bioloških procesov zgodnjega razvoja zarodkov v postopku zunajtelesne oploditve, saj zagotavlja morfološke, dinamične in kvantitativne časovne podatke, pridobljene na neinvaziven način. Razvoj zarodkov osmih parov z oligoastenoteratozoospermijo in sedmih parov z azoospermijo smo spremljali s time-lapse mikroskopijo ter z uporabo Primo Vision programske opreme analizirali podatke o razvoju vsakega posameznega zarodka. Določili smo čas vseh pomembnih dogodkov v razvoju zarodka. Med obema skupinama zarodkov nismo opazili značilnih razlik v dinamiki razvoja. Razvoj zarodkov, nastalih z oploditvijo s spermiji izoliranimi iz testisa, je večinoma potekal nekoliko počasneje v primerjavi z zarodki, nastalimi z oploditvijo s spermiji iz ejakulata. Razlike se kažejo predvsem na stopnji štirih do šestih celic, ko pride do aktivacije zarodkovega genoma, vendar med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 616.697(043.2)
CX infertility/ICSI/time-lapse/TESE/OAT/azoospermia/oligoasthenoteratozoospermia
AU FERK, Kaja
AA VIRANT – KLUN, Irma (supervisor)/BIZJAK MALI, Lilijana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes of Molecular and Functional Biology
PY 2016
TI DEVELOPMENTAL DYNAMICS OF EMBRYOS AFTER FERTILIZATION WITH SPERMATOZOA FROM TESTES AND SEMEN IN THE IN VITRO FERTILIZATION PROGRAMME
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIII, 74 p., 16 tab., 24 fig., 1 ann., 35 ref.
LA sl
AL sl/en
AB When infertile men have no spermatozoa in the ejaculate (azoospermia), the andrologist obtains their immature sperm by testicular (or epididymal) biopsy or aspiration. In the present study we studied the developmental dynamics of embryos after fertilization of oocytes by ejaculated spermatozoa of bad quality (low concentration of spermatozoa, bad motility and morphology of spermatozoa-asthenoteratozoospermia) and testicular spermatozoa in the in vitro fertilization program to evaluate the influence of sperm maturity and origin on developmental dynamics and quality of embryos in couples with severe male infertility. The preimplantation embryo development is a complex process in which the exact timing and sequence of events are essential. The time-lapse microscopy is a new tool which is ideal to study this process since the ability to capture images over the time provides a combination of morphological, dynamic and quantitative information about the developmental events. In this study the embryos of 8 couples with oligoasthenoteratozoospermia and 7 couples with azoospermia were monitored by time-lapse microscopy. The analysis of data on each embryo's developmental dynamics was performed by Primo Vision software. The timings of important embryo developmental events were determined. We did not observe any significant differences in the developmental dynamics of embryos of both groups. Development of embryos derived by testicular spermatozoa was slightly slower in comparison with embryos derived by ejaculated spermatozoa. The differences were mainly found at 4 – 6 cell-stage of development when the activation of the embryonal genome occurs but these differences were not statistically significant.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IXX
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ZGODOVINA POZNAVANJA SPERMIJEV	4
2.2 MOŠKI REPRODUKCIJSKI SISTEM.....	5
2.2.1 Zgradba spermijev.....	8
2.2.2 Spermatogeneza	10
2.3 SPERMIOGRAM	16
2.4 VRSTA MOŠKE NEPLODNOSTI IN VZROKI	17
2.4.1 Nepravilnosti v morfologiji spermijev in semenskih cevk	20
2.5 OPLODITEV	26
2.5.1 Zunajtelesna oploditev	27
2.6 RAZVOJ ZARODKA V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE	31

2.7	TIME-LAPSE MIKROSKOPIJA IN SPREMLJANJE DINAMIKE RAZVOJA ZARODKA.....	38
3	MATERIAL IN METODE	41
3.1	POTEK DELA.....	41
3.2	PRIDOBITEV JAJČNIH CELIC	41
3.3	PRIDOBITEV SPERMIJEV	43
3.4	PRIPRAVA GOJITVENIH POSODIC IN GOJIŠČ ZA ZARODKE.....	45
3.5	POSTOPEK ICSI.....	47
3.6	RAZVOJ ZARODKA IN TIME-LAPSE ANALIZA	48
3.7	SPREMLJANJE RAZVOJNE DINAMIKE ZARODKOV Z MIKROSKOPIRANJEM V ČASOVNIH PRESLEDKIH.....	50
3.8	PRENOS ZARODKA V MATERNICO.....	53
3.9	PACIENTI IN ZARODKI, VKLJUČENI V RAZISKAVO.....	54
3.10	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	54
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	55
4.1	DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV, DOBLJENIH Z ICSI S SPERMIJI IZ EJAKULATA IN S SPERMIJI IZ TESTISOV.....	55
4.2	DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV GLEDE NA NJIHOVO KAKOVOST NA 3. DAN, VKLJUČNO S FRAGMENTACIJO	58
4.3	DEJAVNIKI VPLIVA NA RAZVOJ ZARODKOV DO RAZVOJNE STOPNJE BLASTOCISTE.....	64
4.4	DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV GLEDE NA RAZVOJ DO BLASTOCISTE.....	66
4.5	DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV IN IMPLANTACIJA.....	68
5	SKLEP	70
6	POVZETEK	71
7	VIRI	72

ZAHVALA

PRILOGA

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Referenčne vrednosti za kakovost semena	17
Preglednica 2: Nomenklatura neplodnosti glede na kakovost semena.....	18
Preglednica 3: Barvila za barvanje po Papanicolaou.....	44
Preglednica 4: Uporabljeni materiali in mediji za postopek ICSI.....	45
Preglednica 5: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE do posamezne faze razvoja.....	57
Preglednica 6: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE med posameznimi stopnjami razvoja.	58
Preglednica 7: Dinamika razvoja zarodkov s slabšo kakovostjo, ocenjeno na 3. dan razvoja	59
Preglednica 8: Dinamika razvoja zarodkov z dobro kakovostjo (AA), ocenjeno na 3. dan razvoja.....	60
Preglednica 9: Dinamika razvoja zarodkov s fragmentacijo, večjo od 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan njihovega razvoja.....	62
Preglednica 10: Dinamika razvoja zarodkov, kjer fragmentacije ni ali pa je manjša kot 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan razvoja.....	63
Preglednica 11: Razvoj zarodkov do blastociste (da / ne) glede na starost ženske, število oplojenih jajčnih celic (JC) v postopku in število celic zarodka na 3. dan razvoja.	65
Preglednica 12: Stopnja razvoja zarodkov do blastociste glede na oceno oblike blastomer na 3. dan razvoja	65
Preglednica 13: Stopnja razvoja zarodkov do blastociste (skupina OAT) glede na oceno fragmentacije na 3. dan razvoja	65
Preglednica 14: Stopnja razvoja zarodkov do blastociste glede na izvor spermijev (OAT/TESE).....	66
Preglednica 15: Dinamika razvoja zarodkov iz skupine OAT glede na razvoj do blastociste.	67
Preglednica 16: Dinamika razvoja zarodkov vstavljenih v maternico in s katerimi je prišlo do zanositve.....	68

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Človeški dojenček predoblikovan že v spermiju, kot ga je leta 1694 upodobil Nicolas Hartsoeker	4
Slika 2: Moški reprodukcijski sistem	6
Slika 3: Zgradba spermija (slika levo). Helikoidalni vzorec mikrotubulov (slika desno).	9
Slika 4: Z mitozo diploidnega spermatogonija ter nadaljno mejozo primarnega in sekundarnega spermatocita nastanejo haploidne spermatide, ki se diferencirajo v spermije	10
Slika 5: Pozna spermatida in nastanek ter morfologija strukture TBC med procesom spermiacije	12
Slika 6: Proces spermiacije; v začetni fazi (VII) spermatida vsebuje veliko citoplazme, ki je kasneje (faza VIII) v znatni meri odstranjena	14
Slika 7: Morfologija glave spermija; spermij z normalno glavo skrajno levo in ostalo spermiji z nepravilnostmi glave	21
Slika 8: Shematični prikaz kromosoma Y	24
Slika 9: Izvedba neposrednega vnosa spermija (puščica) v citoplazmo jajčne celice (postopek ICSI) z mikroinjekcijsko pipeto	28
Slika 10: Model razvoja zarodka, postavljen na podlagi korelacije spremljanega razvoja in molekulskih analiz	34
Slika 11: Nivo ekspresije posameznih specifičnih vzorcev izražanja genov glede na fazo razvoja humanega zarodka	38
Slika 12: Prikaz poteka dela	41
Slika 13: Košček tkiva testisa za pripravo spermijev iz testisa za postopek ICSI	44
Slika 14: Gojitvena posodica IVF 4 weil plate NUNC za gojenje zarodkov izven time-lapse sistema	46
Slika 15: Primo Vision WOW dish VITRO IIFE gojitvena posodica	47

Slika 16: Imobilizacija spermija in neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI)	48
Slika 17: Primo Vision mikroskopska enota sistema time-lapse	51
Slika 18: Odprto okno Primo Vision "analyzer" programske opreme, kjer smo spremljali razvoj posameznega zarodka in označevali čas pojava posameznih dogodkov	53
Slika 19: Grafični prikaz dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE do posamezne faze razvoja.....	57
Slika 20: Grafični prikaz dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE med posameznimi razvojnimi stopnjami.....	58
Slika 21: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE s slabšo kakovostjo, ocenjeno na 3. dan razvoja.	60
Slika 22: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE z dobro kakovostjo (AA), ocenjeno na 3. dan razvoja.	61
Slika 23: Dinamika razvoja zarodkov, kjer je fragmentacija večja od 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan njihovega razvoja.....	63
Slika 24: Dinamika razvoja zarodkov, kjer fragmentacije ni ali pa je manjša od 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan razvoja.	64

KAZALO PRILOG

Priloga A: Laboratorijski obrazec za postopek zunajtelesne oploditve

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
A	astenozoospermija
ACE	angl. <i>Angiothensin Converting Enzyme</i>
BL	blastocista
C	celični (npr. 2C – dvocelični)
CABVD	angl. <i>congenital absence of vas deferens</i> / slov. prirojena odsotnost semenovodov
CFTR	angl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> / slov. transmembranski urejevalec cistične fibroze
cGMP	ciklični gvanozinmonofosfat
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ER	endoplazmatski ritikulum
ES	ektoplazmična specializacija
ESSPs	angl. <i>Embryonic stage specific paterens</i> / slov. za fazo specifični vzorci izražanja
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
FSH	folikel spodbujajoči hormon
GnRH	hipotalamični sproščevalni hormon gonadotropinov
ICSI	angl. <i>intracytoplasmic sperm injection</i> / slov. neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice
IVF	<i>in vitro</i> fertilizacija; zunajtelesna oploditev; umetna oploditev
LH	luteinizirajoči hormon
MAR	angl. <i>Mixed Agglutination Reaction</i> / slov. reakcija z antiglobulini
MO	morula
NO	dušikovoksid
NRY	ne-rekombinantni Y
OAT	oligoastenoteratozoospermija
p	statistična značilnost
PAR	psevdoavtosomalni del kromosoma
RNK	ribonukleinska kislina

SCOS	sindrom Sertolijevih celic
T	teratozoospermija
TBC	tubulobulbarni kompleks
TLM	time-lapse mikroskopija

1 UVOD

Spolno razmnoževanje zahteva produkcijo haploidnih spolnih celic v gonadah (gametogeneza) in združitve dveh različnih spolnih celic, za nastanek diploidne zigote (oploditve). Parjenje, korak med tema dvema procesoma, zbliža jajčece in spermije dovolj blizu skupaj, da lahko pride do oploditve (Purves in sod., 2003).

V semenu zdravega moškega je od 15 milijonov do več kot 100 milijonov semenčic ali spermijev. Le manjši del semenčic, pa je v normalnih pogojih sposobnih oploditve jajčne celice (World Health Organization, 2010).

Neplodnost je, po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO), nezmožnost zanositve pri paru po enem letu rednih, nezaščitenih spolnih odnosov in je eden izmed glavnih zdravstvenih problemov na svetu. Moška neplodnost predstavlja 30–55 % neplodnosti pri parih v reproduktivnem obdobju. Pomemben je dovolj zgoden pristop k ugotavljanju moške neplodnosti. Glede na prisotnost ali odsotnost normalne spolne funkcionalnosti, je moška neplodnost razdeljena na dva fenotipa z različno patologijo: 1) moška neplodnost z normalno spolno funkcijo (astenozoospermija, oligozoospermija, teratozoospermija, azoospermija) in 2) moška neplodnost s spolno disfunkcijo (erektalna disfunkcija). Erektalna disfunkcija, definirana kot nezmožnost erekcije ali nezmožnost ohranitve erekcije pri spolnem odnosu, ima znaten vpliv na kvaliteto življenja milijonov moških. Še pogostejši vzrok moške neplodnosti pa je slaba kakovost semena. Stopnjo pacientov z normalno spolno funkcijo, a z abnormalnostjo spermijev, se navadno določa s kvalitativnimi (astenozoospermija) in kvantitativnimi (azoospermija) preiskavami (Zhou in sod., 2016). Osnovna preiskava moške neplodnosti – spermioogram – poteka z analizo kakovosti semenskega izliva (volumen semenskega izliva, koncentracija, gibljivost in morfologija spermijev).

Molekularni mehanizmi neplodnosti pri moških so še vedno dokaj nepoznani. Pri 60–75 % pacientov z diagnozo neplodnosti ni mogoče določiti jasnega vzroka za neplodnost (Zhou in sod., 2016).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Zdravljenje neplodnosti pri moških je lahko uspešno samo z zunajtelesno oploditvijo, natančneje z neposrednim vnosom spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI), pri čemer v vsako jajčno celico partnerice pod mikroskopom in s pomočjo mikromanipulacijskega sistema vbrizgamo po en spermij. Pogosto se dogaja, da neplodni moški v semenskem izlivu nimajo spermijev (azoospermija ali aspermija). Pri teh pacientih androlog pridobi spermije iz testisov (redkeje nadmodka) z biopsijo ali aspiracijo, s katerimi nato z metodo

ICSI jajčne celice oplodijo. Po oploditvi z metodo ICSI se preveri uspešnost oploditve jajčnih celic z ugotavljanjem prisotnosti dveh pronukleusov in dveh polarnih teles.

Slabost uporabe spermijev direktno iz testisov je v tem, da so zaradi nezrelosti slabše gibljivi ali pa so popolnoma negibljivi. Z negibljivimi spermiji so rezultati zunajtelesne oploditve slabši kot z gibljivimi spermiji. V tkivu testisov pa so lahko spermiji zelo maloštevilne in včasih potrebujemo v postopku zunajtelesne oploditve po pridobitvi jajčnih celic pri ženski kar precej časa, da v tkivu testisa partnerja najdemo dovolj spermijev za oploditev vseh pridobljenih jajčnih celic pri partnerici (Virant-Klun, 2004).

Kakovosti zgodnjih zarodkov pridobljenih v postopku zunajtelesne oploditve se ocenjuje predvsem na osnovi njihove oblike oziroma morfologije, saj so morebitni ostali pokazatelji kakovosti še slabo poznani. Ključni klinično uporabni parametri kakovosti zarodka v zgodnjih razvojnih stopnjah je morfologija, število in oblika celic ter fragmentacija (prisotnost fragmentov brez jedra). Bolj fragmentirani zarodki se običajno slabše razvijajo do razvojne stopnje blastociste in imajo manjšo možnost ugnezditve v maternici. Zarodek dobre kakovosti ima manj kot 10 % fragmentov, celice so približno enake oblike in velikosti. Pomembna je tudi struktura in homogenost citoplazme ter normalna debelina in nepoškodovanost zone pellucide, ki jajčno celico obdaja. Pomemben kriterij za kakovost zarodka v postopku zunajtelesne oploditve pa je tudi več jeder v vsaj eni od novo nastalih celic (Virant-Klun, 2004).

1.2 CILJI NALOGE

Med novejšimi in obetajočimi metodami ugotavljanja kakovosti zarodkov v programu zunajtelesne oploditve je spremljanje dinamike njihovega razvoja v časovnih presledkih, to je tako imenovana time-lapse tehnika mikroskopije. V nasprotju z vsakodnevnim spremljanjem zarodka ima kontinuirano spremljanje v časovnih presledkih (time-lapse metoda) prednosti. In sicer, natančno lahko po oploditvi jajčne celice določimo dolžino razvojnih faz med razvojem zarodka od prve celične delitve preko nadaljnjih delitev vse do razvojne stopnje blastociste in morfološke dogodke v njegovem razvoju, vključno z delitvijo, kompakcijo celic, blastulacijo, fragmentacijo in reabsorpcijo (Pribenszky in sod., 2010). Raziskave s time-lapse mikroskopijo so pokazale, da s kontinuiranim opazovanjem morfologije zgodnjih zarodkov in natančnega časa ključnih dogodkov v njihovem razvoju pridobimo natančne podatke, iz katerih lahko napovemo potek nadaljnjega razvoja zarodka, uspešnost implantacije in nosečnosti. Vsako prezgodnjo/prepozno delitev celic lahko povežemo s časovno odvisno nepravilnostjo v razvoju zarodka (Knez in sod., 2013).

Namen te naloge je bil ugotoviti, ali se se pri neplodnih moških dinamika razvoja zarodkov po oploditvi s spermiji iz testisa pri pacientih z azoospermijo razlikuje od zarodkov po

oploditvi s spermiji iz ejakulata pri pacientih s poslabšano kakovostjo semena (oligoastenoteratozoospermijo) in kakšne so te razlike.

Čeprav je bilo narejenih že veliko raziskav, ki so poročale o številnih uspešnih nosečnostih po postopku ICSI, ki je v primeru uporabe spermijev, pridobljenih iz testisov nekoliko nižja, je bilo na voljo le nekaj podatkov o vplivu izvora spermijev (spermiji iz ejakulata ali kirurško pridobljeni spermiji) na zgodnji razvoj zarodka v postopku zunajtelesne oploditve (Lammers in sod., 2015).

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevamo, da je dinamika razvoja zarodkov v postopku zunajtelesne oploditve s spermiji iz testisa drugačna kot po oploditvi s spermiji iz ejakulata.
- Pričakuje se slabši razvoj zarodkov do blastociste po oploditvi s spermiji iz testisa, kar bi lahko razložilo nižjo stopnjo zanositve, ki jo opisujejo v primeru oploditve jajčnih celic s spermiji iz testisa.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA POZNAVANJA SPERMIJEV

Šele zadnjih dobrih 135 let je znana vloga spermijev pri oploditvi. Anton van Leeuwenhoek, pionir mikroskopije, ki je sodeloval pri odkritju spermijev leta 1670, je sprva verjel, da gre za parazitske živali, ki živijo v semenski tekočini (od tukaj tudi poimenovanje *spermatozoa*). Čeprav je prvotno domneval, da gre za nekaj, kar nima zveze z reprodukcijo organizma, iz katerega so izviral, je kasneje začel verjeti, da vsak spermij vsebuje predobliko človeškega mladiča. Leta 1685 je zapisal, da je spermij "seme" in da ženska zagotavlja "zemljo", bogato s hranili, kamor se seme zasadi. S tem se je vračal k pojmovanju razmnoževanja, kot ga je opisoval že Aristotel 2000 let pred tem (Gilbert, 2014).

Leeuwenhoek je poskušal na vsak način dokazati, da se predoblika zarodka nahaja znotraj spermatozoa. Nicolas Hartsoeker, drugi pri soodkritju spermijev, je leta 1694 narisal sliko tega, kar je želel najti znotraj spermija: miniaturnega človeka, "homunculus-a" (Slika 1).



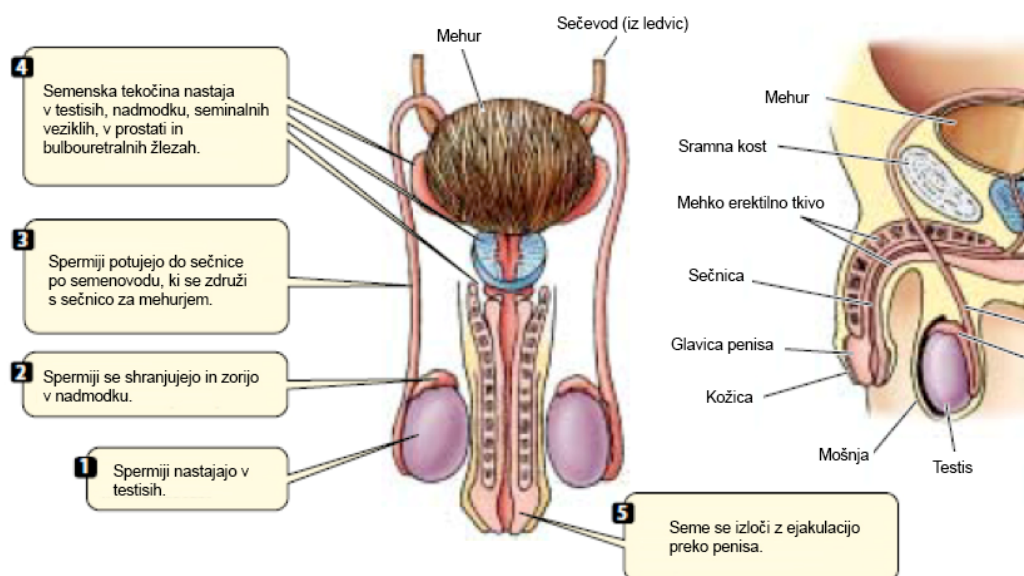
Slika 1: Človeški dojenček predoblikovan že v spermiju, kot ga je leta 1694 upodobil Nicolas Hartsoeker (Gilbert, 2014)

Večina raziskovalcev v obdobju pred začetkom 18. stoletja je imela spermije za nepomembne. Prvi dokazi vloge spermijev pri reprodukciji izhajajo iz številnih poskusov

Lazzara Spallanzani v poznih letih okoli 1700. Spallanzani je dokazal, da je za funkcionalnost jajčne celice potreben "dotik" spermija z jajčno celico. Kot večina ostalih raziskovalcev je bil mnenja, da so spermatične "živali" zajedalci v semenski tekočini; menil je, da se zarodek nahaja znotraj jajčne celice in da je za njegovo aktivacijo potrebna semenska tekočina. Kasneje je kombinacija boljših mikroskopskih leč in razlage celične teorije (da vse življenje temelji na celicah in da vsaka celica izhaja iz predhodno obstoječe celice) vodila k novim razumevanjem funkcije spermijev. Leta 1824 sta J. L. Prevost in J. B. Dumas trdila, da spermiji niso paraziti, pač pa aktivni predstavniki v procesu oploditve. Ugotovila sta univerzalno prisotnost spermijev pri spolno zrelih moških in njihovo odsotnost pri nezrelih in ostarelih posameznikih. Predpostavljala sta, da spermiji vstopijo v jajčno celico in da imajo pomembno vlogo pri potomcih. Ta dognanja so bila vse do leta 1840 neupoštevana, dokler ni A. von Kolliker opisal nastanka spermijev iz predhodnih celic v odraslih testisih. Von Kolliker se je posmehoval ideji, da je semenska tekočina lahko normalna, če vsebuje tako veliko število "parazitov". Verjel je, da spermij spodbudi jajčno celico k razvoju, podobno kot deluje privlačnost med magnetom in kovino, če sta v bližini. Leta 1876 sta Oscar Hertwig in Herman Fol neodvisno ponazorila vstop spermija v jajčno celico in združitev obeh celičnih jeder. Za raziskovanje je Hertwig uporabljal mediteranske morske ježke (*Paracentrotus lividus*). Ko je zmešal suspenzijo spermijev s suspenzijo jajčnih celic, je Hertwig opazil vstop spermija v jajčno celico in združitev jeder obeh spolnih celic. Prav tako je ugotovil, da v jajčno celico vstopi le en spermij in da so vsa jedra razvijajočega se zarodka izhajala iz mitotsko delečega se jedra, nastalega po oploditvi. Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Fol, ki je nekoliko raziskal tudi mehanizem vstopa spermija v jajčno celico. Tako je bila oploditev spoznana kot združitev spermija in jajčne celice (Gilbert, 2014).

2.2 MOŠKI REPRODUKCIJSKI SISTEM

Seme ali semenska tekočina je sekret moških spolovil, ki vsebuje semenčice ali spermije (Slika 2). Poleg spermijev sestavljajo ejakulat še epiteljske celice iz genitalnega trakta, levkociti in nezrele germinalne celice (World Health Organization, 2010). Vsebuje tudi raznoliko mešanico tekočin in molekul, ki oskrbujejo spermije in omogočajo oploditev (Purves in sod., 2003). Številni encimi oziroma proteini z več kot eno encimsko aktivnostjo v semenski tekočini varujejo spermije, predvsem pred oksidativnim stresom (Zorn in sod., 2000 citirano po Virant-Klun, 2004). Spermiji predstavljajo manj kot 5 % volumna semenske tekočine (Purves in sod., 2003). Slednja je bogata z označevalci delovanja moških spolnih organov. Encim alfa-glukozidaza in karnitin kažeta na delovanje nadmodka, cink in kislja fosfataza pa na delovanje prostate. Povišana elastaza v semenski tekočini pomeni vnetje genitalnega trakta (Virant-Klun, 2004).



Slika 2: Moški reprodukcijski sistem (Purves in sod., 2003: str. 832)

Spermiji nastajajo v modih (testisih), v parnih moških gonadah. Pri večini sesalcev se testisi nahajajo izven telesne votline, v nagubani mošnji (lat. in angl. *scrotum*). Optimalna temperatura procesa spermatogeneze (proces nastajanja in zorenja spermijev) je pri večini sesalcev nekoliko nižja od normalne telesne temperature in ravno v mošnji so testisi na optimalni temperaturi. Mišice v mošnji se skrčijo v mrzlih pogojih, kar potegne testise bližje k toploti telesa. Pri vročih pogojih so mišice sproščene in testisi so spuščeni od telesa. Testise pri sesalcih sestavljajo tesno zavite semenske cevke (lat. *tubuli seminiferi*), znoraj katerih poteka spermatogeneza. Vsako semensko cevko gradi slojevit epitelij. V zunanjih slojih epitelija se nahajajo spermatogoniji. Od zunanjih slojev epitelija proti lumnu semenske cevke se nahajajo kasnejše stopnje germinalnih celic v procesu spermatogeneze. Te spolne celice so povezane s Serolijevimi celicami, ki jih varujejo in oskrbujejo s hranili, potrebnimi za razvoj, ter so vključene v hormonsko regulacijo spermatogeneze. V vezivu med semenskimi cevkami so skupine tako imenovanih Leydigovih celic, ki tvorijo hormon testosteron. Iz semenskih cevk oziroma testisov se spermiji pomikajo v skladiščno strukturo moških spolovil, imenovano nadmodek (lat. in angl. *epididymis*), kjer nadalje zorijo in postanejo gibljivi.

Nadmodek je povezan s sečnico preko semenovoda (lat. in angl. *vas deferens*). Sečnica izhaja iz ledvic in poteka skozi penis proti zunanosti, do njegovega vrha. Služi kot skupno izvodilo urinarnega in reprodukcijskega sistema. Pod sečnim mehurjem obdaja začetni del sečnice žleza obsečnica, imenovana tudi prostata. Prostata izloča redko, motno tekočino, ki predstavlja 25–30 % volumna semena. Poleg tega izloča tudi encime, ki vplivajo na proteine v semenu, tako da se ta spremeni v želatinasto tekočino (Purves in sod., 2003).

Moške spolne organe predstavljata mošnja in penis. Seksualna vzburjenost sproži odgovor v živčnem sistemu, ki ima za posledico erekcijo. Živčni končiči izločajo dušikov oksid (NO), plinaste živčne prenašalce, ki se po krvnih žilah prenašajo do penisa. Prisotnost NO stimulira produkcijo sekundarnega obveščevalca cikličnega gvanozinmonofosfata (cGMP), ki povzroči razširitev žil in posledično kri napolni mehko spužvasto erektilno tkivo, ki se nahaja vzdolž penisa. Ejakulacijo povzroči kontrakcija zunanjih mišic na dnu penisa, ki obdajajo sečnico. Togost penisa omogoča, da kontrakcija teh mišic s silo potisne želatinozno maso semena skozi sečnico iz penisa.

Po doseženi ejakulaciji avtonomni živčni sistem zamenja signalizacijo. Izločanje NO upade, encimi razgradijo cGMP, kar povzroči zoženje žil in nižji krvni tlak v erektilnem tkivu. Erekcija upade.

Erektilna disfunkcija ali impotenca je nesposobnost erekcije ali vzdrževanja erekcije in jo štejemo med moško neplodnost s spolno disfunkcijo (Purves in sod., 2003).

Pri višjih primatih, vključno s človekom, so poznane tri različne faze razvoja in delovanja moškega reprodukcijskega sistema, ki so pod ustreznim hormonskim nadzorom in trajajo od poporodne dobe, ob povezavi hipotalamus – hipofiza – testisi, do odrasle dobe. Prva faza je neonatalna faza in faza v obdobju dojenčka, v kateri poteka podobna aktivnost kot pri odraslih, to je os hipotalamus – hipofiza – testisi, vendar z odsotnostjo spermatogeneze. Druga faza je dolgotrajna faza obdobja otrok – mladoletnik, ko je povezava na osi hipotalamus – hipofiza – testisi mirujoča. V končni fazi je os hipotalamus – hipofiza – testisi ponovno aktivna; spremlja jo puberteta z začetkom spermatogeneze, ki vodi v razvoj normalno delujočih odraslih testisov. Na ravni testisov in spermatogeneze delujeta gonadotropina adenohipofize, folikel spodbujajoči hormon (FSH) in luteinizirajoči hormon (LH), ki vplivata preko posebnih transmembranskih receptorjev, FSH – R in LH – R. Receptor FSH – R je prevladujoče izražen v Sertolijevih celicah znotraj semenskih cevč, medtem ko je LH – R izražen v vmesnih Leydigovih celicah. Oba FSH (neposredno) in LH (posredno preko testosterona – androgen receptorja, AR) sodelujeta pri spermatogenezi, predvsem z regulacijo celičnih dejavnikov v Sertolijevih celicah.

Kot odgovor na omenjena gonadotropina se v testisih proizvajata dva glavna endokrina signala: steroidni hormon testosteron, ki ga proizvajajo Leydigove celice v odgovor na LH signalizacijo in je izločen na pulzativen način, ter nesteroidni hormon inhibin, ki ga proizvajajo Sertolijeve celice kot odziv na FSH signalizacijo in je izločen na nepulzirajoči način. Zanimivo je, da raziskave na *Rhesus* opicah kažejo na zaviralno vlogo testosterona na sekrecijo inhibina B. Oba omenjena hormona predstavljata glavna povratna signala, ki vzdržujeta fiziološko delovanje osi hipotalamus – hipofiza (Ramaswamy in Weinbauer, 2014). Spermatogeneza in vzdrževanje moških sekundarnih spolnih znakov sta torej odvisna od testosterona. Porast testosterona v puberteti pri moških povzroči razvoj

sekundarnih spolnih znakov in pospeši rast. Pospeši tudi povečanje mišične mase in zorenje testisov. Kontinuirana produkcija testosterona po puberteti pa je nujna za ohranjanje sekundarnih spolnih znakov in za nastajanje semena (Purves in sod., 2003).

2.2.1 Zgradba spermijev

Normalen zrel spermij je sestavljen iz ovalne glave, vratu, srednjega dela in dolgega repa (Slika 3). Glavo sestavlja jedro z genetskim materialom in akrosom z encimi za razgradnjo zone pellucide pri oploditvi jajčne celice. Po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije je normalna dolžina glave spermija od 4 do 5 μm , širina pa 2,5 do 3,5 μm ter dolžina repa 45 μm . Akrosom zavzema 40–70 % glave. V srednjem delu spermija je veliko mitohondrijev, ki so potrebni za nastanek energije za aktivno gibanje spermija, rep pa omogoča mehansko gibanje spermija (Virant-Klun, 2004).

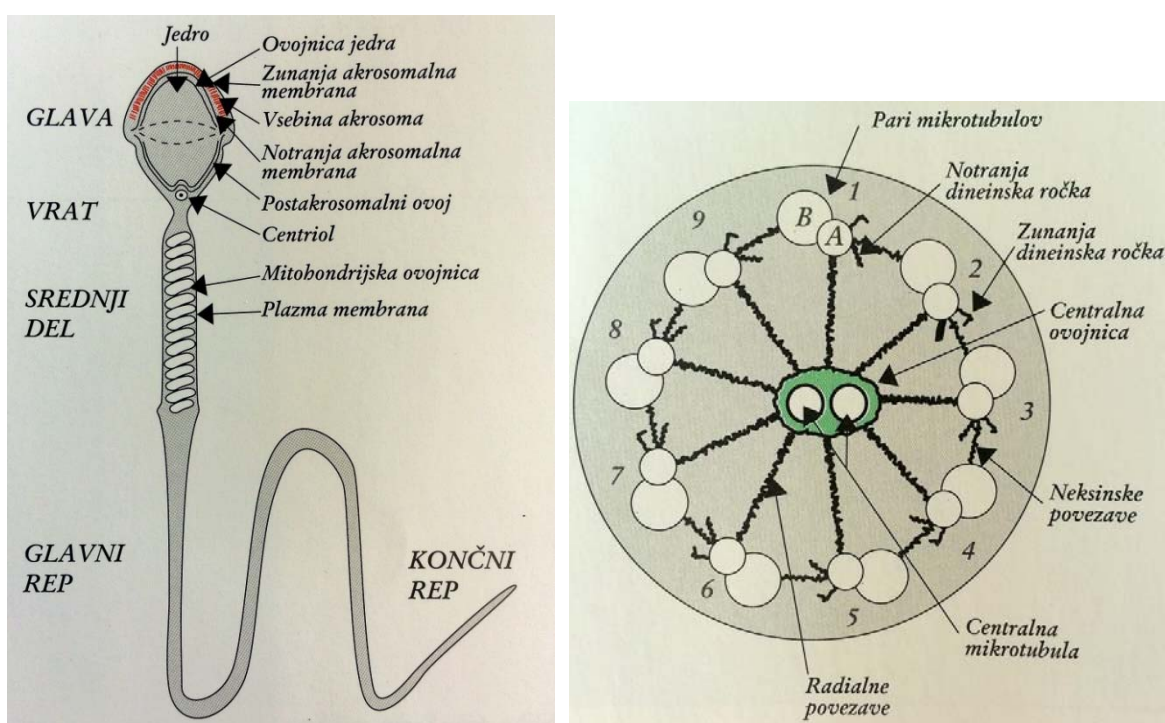
Vsak spermij ima svoje lastne individualne značilnosti, obliko oziroma morfologijo in način gibanja (Virant-Klun, 2004). Glede na kriterije Svetovne zdravstvene organizacije je v semenu zdravega moškega 15 milijonov do več kot 100 milijonov spermijev na mililiter, vsaj 4 % spermijev ima normalno obliko (morfologijo) in vsaj 40 % je napredujoče gibljivih (World Health Organization, 2010). Pri parih, ki prihajajo na Ginekološko kliniko, UKC Ljubljana, podobno kot drugje v razvitem svetu pri približno dveh tretjinah moških v postopku zunajtelesne oploditve opažajo slabšo kakovost semena (Virant-Klun, 2004).

V obarvanem preparatu opazimo pri glavah spermijev dva različno obarvana predela, akrosomski in postakrosomski predel. Akrosom pokriva dve tretjini glave spermija in vsebuje različne encime s pomembno vlogo pri prodiranju spermija skozi ovojnico jajčne celice v procesu oploditve. Postakrosomski del glave vsebuje jedro, ki sega prav pod akrosom in obsega približno 65 % glave spermija. Glava spermija je torej sestavljena predvsem iz jedra, ki vsebuje zelo kompakten kromatin in posamezna področja razpršenega kromatina ter vakuol. Anteriorni del sestavlja akrosom, posteriorni del pa je postnuklearni del, sestavljen iz enojne membrane in ga imenujemo tudi ekvatorialni segment (Virant-Klun in sod., 2002).

Srednji del, ki ga z glavo povezuje komaj viden vrat, je približno 5 μm dolg, 1 μm debel, z mitohondriji obdan spiralast predel, ki tvori metabolične encime za razgradnjo energetske bogatih snovi in omogoča gibljivost spermija. Sestavljen je iz dveh centriolov, aksoneme in ovojnice iz mitohondrijev, ki ovija aksialni filament v helikoidalnem vzorcu (Virant-Klun in sod., 2002).

Glavni del motoričnega dela repa predstavlja aksonema, struktura iz mikrotubulov, ki izvirajo iz centriola na bazi jedra spermija. Osrednji del aksoneme sestavljata dva osrednja

mikrotubula, obdana z nizom devetih parov mikrotubulov. Samo en mikrotubul v paru je popolnoma okrogel in ima 13 protofilamentov, drugi pa ima obliko črke C in samo 11 protofilamentov (Slika 3). Medsebojno povezane protofilamente sestavlja izključno dimerni protein tubulin. Čeprav je tubulin osnovna struktura repa (lat. *flageluma*), so za normalno delovanje ključnega pomena tudi ostali proteini. Moč pogona spermiju omogoča dinein, protein pritrjen na mikrotubule. Dinein je v osnovi ATPaza, encim, ki hidrolizira ATP in pretvarjanje sproščeno kemijsko energijo v mehansko. Ta energija omogoča aktivno drsenje zunanjih parov mikrotubulov, zaradi česar se rep spermija zvija in povzroča progresivno gibanje. Pomembnost dineina lahko vidimo pri posameznikih z genetskim sindromom imenovanim Kartagenerjeva triada. Ti posamezniki nimajo funkcionalnega dineina v vseh svojih migetalkastih in bičkastih celicah, zaradi česar so te strukture patološko negibljive (Gilbert, 2014).



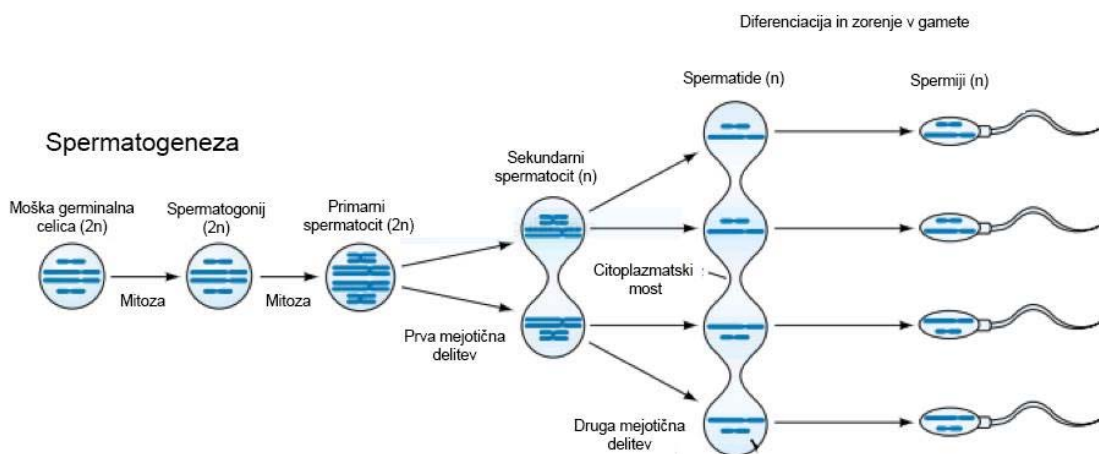
Slika 3: Zgradba spermija (slika levo). Helikoidalni vzorec mikrotubulov (slika desno) (Virant – Klun in sod., 2002)

Rep spermija ima dva različna predela, glavni in končni del. Glavni del je daljši, dolžine 45 μm in debeline 0,5 μm s fibroznim ovojem. Konec repa pa je dolg 5 do 7 μm . V glavnem delu repa je 9 parov perifernih in 1 centralni par mikrotubulov aksoneme, obdan s fibrozno ovojnico, ki jo sestavljajo polkrožni trakovi. Zunanji pari sestojijo iz mikrotubulov tipa A in B. Iz mikrotubula A se proti mikrotubulu B raztezajo notranje in zunanje dineinske ročice. Končni del repa nima zunanjih vlaken in ovojnice (Virant-Klun in sod., 2002).

2.2.2 Spermatogeneza

Spermatogeneza je proces nastanka in diferenciacije spermijev. Poteka v semenskih cevkah (seminiferni tubuli) v testisih. Začne se med puberteto na stopnji spermatogonija. Ko moški spolno dozori, se spermatogoniji začno nadalje deliti. Iz diploidnega primarnega spermatocita se z mejotsko delitvijo oblikuje sekundarni spermatocit, ki je haploiden. Iz vsakega primarnega spermatocita, ki vstopi v sekundarno mejozo, nastanejo štiri haploidne spermatide, ki ostanejo povezane preko citoplazmatskega mostička. Polovica sekundarnih spermatocitov prejme kromosom X, druga polovica pa kromosom Y. Spermatida je le malo podobna zrelemu spermiju. Ta z nadaljnjo diferenciacijo postane kompakten, aerodinamično oblikovan in gibljiv spermij (Slika 4) (Purves in sod., 2003).

Spermatogeneza torej poteka v več fazah; kot mitotska delitev spermatogonijev, mejotska delitev spermatocitov in pretvorba okroglih spermatid v spermije (Slika 4). Proces od spermatogonija do gibljivega spermija traja približno dva meseca. Spermatogeneza je kontinuiran proces, pri katerem se vsak dan začne nov cikel diferenciacije približno 1,5 milijona spermatogonijev. V reproduktivnem obdobju moškega nastane približno 30 milijonov spermijev na dan (Virant-Klun in sod., 2002).



Slika 4: Z mitozo diploidnega spermatogonija ter nadaljno mejozo primarnega in sekundarnega spermatocita nastanejo haploidne spermatide, ki se diferencirajo v spermije (Purves in sod., 2003: str. 823).

2.2.2.1 Spermioogeneza in spermiacija

V procesu spermioogeneze se spermatide pretvorijo v spermije. V spermatidah je DNK močno kondenzirana. Pomemben del dozorevanja spermatid je dozorevanje jedra, pri čemer se histoni zamenjajo s protamini. Čeprav jedro spermatide že vsebuje haploidni set kromosomov, avtosomni kromosomi nadaljujejo s sintezo majhne količine ribosomalnih in

sporočevalnih nukleinskih kislin ter proteinov. Tako postane spermatidina DNK močno kondenzirana in obdana z nukleoproteinskimi protamini, ki zamenjajo predhodne histone. Če zamenjava histonov s protamini ni zadostna, se oploditvena sposobnost spermijev zmanjša. Zaporedje citoplazmatskih in jedrnih sprememb v spermatidi pogojuje nastanek glave spermija. Rep nastane iz centriola blizu baze jedra. Zorenje spermatid vključuje rast repa in izgubo citoplazme. Dozorevanje vključuje morfološke, fiziološke in metabolne spremembe (Virant-Klun in sod., 2002).

Spermiacija je sprostitvev zrelih spermatid iz Sertolijevih celic v lumen semenskih cevk. Proces vključuje posamezne korake, kot so oblikovanje glave spermatide in preoblikovanje jedra ter citoplazme, odstranitev specializiranih adhezijskih struktur in končno sprostitvev spermatide v lumen semenske cevke. Spermiacija se vrši pod koordiniranimi interakcijami različnih struktur, celičnih procesov in adhezijskih kompleksov, ki tvorijo "spermiacijsko mašinerijo". Spermiacija ima glede na svojo vlogo preoblikovanja spermatid in njihovo sprostitvev pomemben vpliv na plodnost pri moških, zato je ključnega pomena usklajeno in pravilno delovanje "spermiacijske mašinerije".

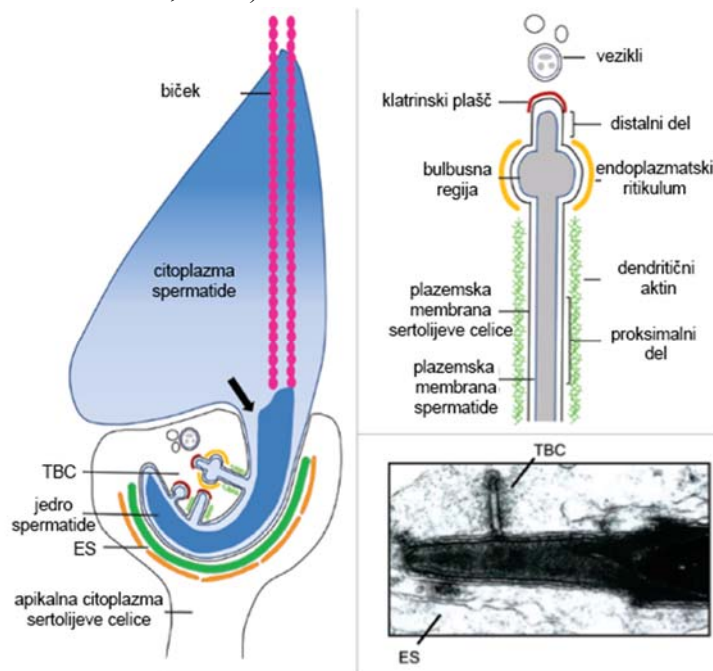
Podaljšana spermatida je v kontaktu s Sertolijevo celico preko obsežne strukture, imenovane ektoplazmična specializacija (ES) (O'Donnell in sod., 2011). Gre za medcelično povezavo med Sertolijevo celico in spermatido, sestavljeno iz snopov aktinskih filamentov, ki so stisnjeni med cisterno endoplazmatskega ritikuluma in plazmatsko membrano Sertolijeve celice (Grove and Vogl, 1989). ES, povezana z mikrotubuli in motornimi proteini, sodeluje pri translokaciji spermatide skozi epitelij. Spermatida se z ES pomakne v uvihek Sertolijeve celice, kar poveča površino interakcije med spermatido in Sertolijevo celico ter komunikacijo med njima.

Ob začetku spermatogeneze ima spermatida veliko citoplazme, ki je ovita v citoplazmo Sertolijeve celice. Glavni cilj spermiacije je razpad apikalne ES in priprava na sprostitvev spermatide v lumen semenskih cevk. Pri tem se skupine spermatid iztegujejo v lumen, Sertolijeva celica pa jih še dalje, a manj obsežno obdaja. Spermatide so podvržene močnim silam toka, ki jih vodi od semenskih cevk do predela testisa z mrežjem ravnih semenskih cevk, imenovanem rete testis.

V kasnejši fazi spermiacije se na ventralni strani ukrivljene glave spermatide, v območju kjer ni ES, oblikuje tubulobulbarni kompleks (TBC), ki ga sestavljata membrani spermatide in Sertolijeve celice. Kompleks sestavljajo z aktinom bogate strukture, ki pomagajo vzpostaviti tesen stik med zrelo spermatido in Sertolijevo celico v procesu spermiacije ter sodelujejo pri odstanjevanju odvečne citoplazme spermatide in pripravijo zrele spermatide na sprostitvev v lumen.

Obstaja hipoteza, o povezanosti med razstavitvijo ES in formacijo TBC. TBC se začne oblikovati, ko se majhna količina citoplazme spermatide začne iztegovati na eno stran Sertolijeve celice, bočno ob strukturi ES in v smeri, kjer je notranja stran membrane Sertolijeve celice prekrita s klatrinskimi vdolbinicami (angl. *bristle-coated pits*) vključenimi v endocitozo. Klatrin bi lahko bil vključen v začetek oblikovanja TBC in rekrutiranje aktinskega citoskeleta nastajajočega kompleksa TBC. Dolg proksimalni del TBC je obdan z dendritičnim aktinom, v širši gomoljasti regiji je endoplazmatski ritikulum (ER). Kratek distalni del TBC se zaključi z vrhnjim delom, ki ga prekriva klatrinski plašč. Klatrin sodeluje pri razvrščanju in pakiranju potranslacijskih transportnih proteinov v plazemski membrani v zgodnji endosom. V območju distalnega konca kompleksa se nahajajo vezikli z dvojno membrano, ki se tvorijo iz bulbusne regije (Slika 5). Dinamiko aktinskega citoskeleta med oblikovanjem TBC regulira kompleks Arp2/3, sestavljen iz sedmih proteinskih podenot. Pri elongaciji TBC imajo torej pomembno vlogo proteini, povezani s kompleksom Arp2/3 in N-WASP gen, ki aktivira kompleks Arp2/3.

Med nastankom TBC pride do obsežnega zmanjšanja volumna citoplazme, kar kaže na sodelovanje teh struktur pri odstranjevanju citoplazme pri spermatidah. Poleg tega sodeluje TBC pri odstranjevanju ES adhezijskih povezav med membrano spermatide in Sertolijeve celice. Omenjeno hipotezo potrjuje dejstvo, da so TBC in endosomi povezani s tem kompleksom ter vključujejo strukturne molekule, povezane z ES in tudi komponente adhezijskih domen ES (nektin-2,-3, nektin-aktin povezovalni protein afadin). Prav tako lahko rečemo, da TBC sodeluje pri oblikovanju glave spermatide in akrosoma med spermiacijo (O'Donnell in sod., 2011).



Slika 5: Pozna spermatida in nastanek ter morfologija strukture TBC med procesom spermiacije (O'Donnell in sod., 2011)

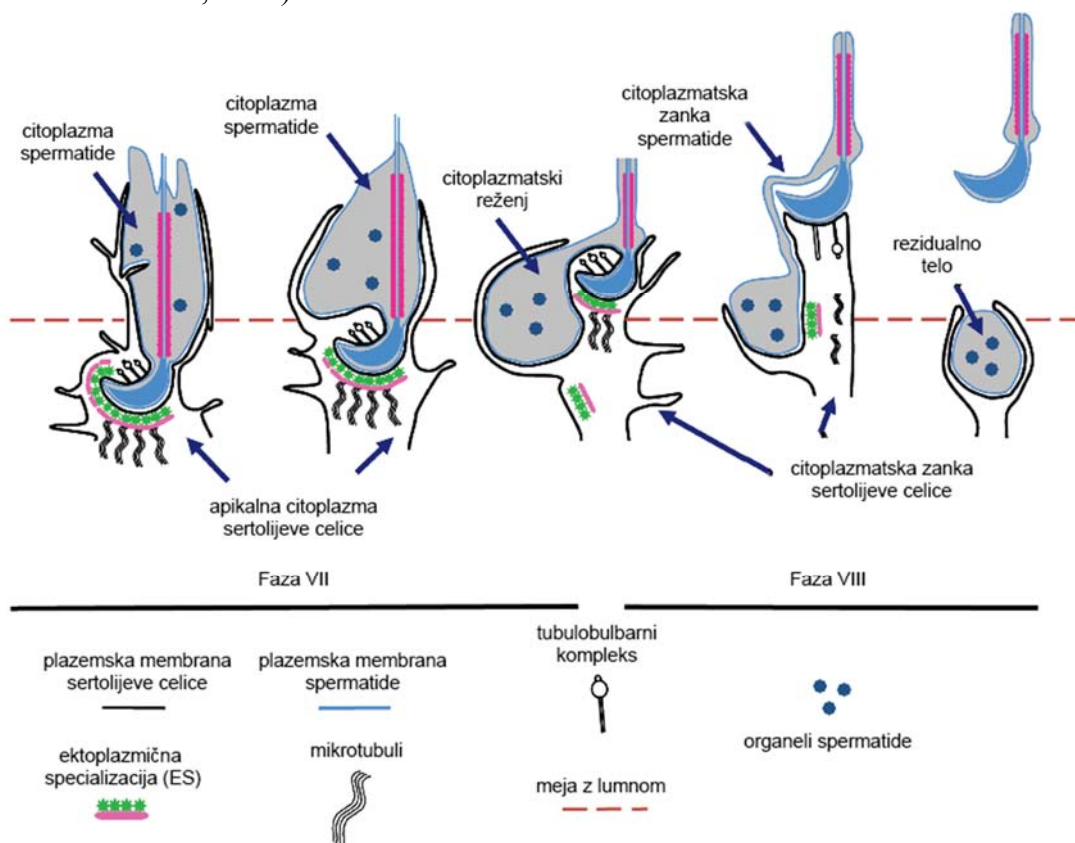
Med spermiacijo, natančneje po oblikovanju TBC, sta glava spermatide in rep vedno bolj podaljšana v lumen semenske cevke. Podaljšanje se vrši s pomočjo mikrotubulov citoplazmatske zanke Sertolijeve celice. Med iztegovanjem spermatide v lumen semenske cevke ostaja citoplazma spermatide znotraj epitelija in se kasneje nahaja nižje glede na glavo spermatide (Slika 6) ter se kondenzira. Oblikuje se tako imenovani citoplazmatski reženj, ki se loči od v lumen sproščene spermatide in ostane zasidran znotraj semenske cevke ter se oblikuje v rezidualno telo (O'Donnell in sod., 2011).

Na odstranjevanje citoplazme lahko vpliva spermatida sama, s proteini, ki so vključeni v dinamične spremembe v njihovem citoskeletu. Raziskave so pokazale (Geyer in sod., 2009, cit. po O'Donnell in sod., 2011), da se mutacije v genu *Capza3* pri miših izrazijo kot neplodnost zaradi nenormalne morfologije spermijev in napake pri izgubi presežka citoplazme med spermiacijo. Protein *Capza3* se nahaja v citoplazmi podaljšanih spermatid in je aktin prekrivajoči protein, vključen v regulacijo dinamike F-aktina. Pri teh študijah ni prišlo do zadrževanja spermatid v epiteliju ali do njihove fagocitoze, vendar obstajajo dokazi, ki kažejo na to, da se spermatide z nenormalno citoplazmo dlje časa zadržujejo v epiteliju (Geyer in sod., 2009, cit. po O'Donnell in sod., 2011).

Ključni korak v procesu spermiacije je odstranitev strukture ES. Ta struktura je sprva obsežna in obdaja celoten predel jedra spermatide med elongacijsko fazo spermiogeneze (Slika 6). Odstranitev je esencialna za sprostitev spermatide v lumen semenske cevke. Lokalni razpad ES je povezan z oblikovanjem TBC. Ta se oblikuje in je najbolj obsežna na ventralnem delu glave spermatide. Ob odstranitvi ES in premiku citoplazme se TBC začnejo oblikovati tudi v dorzalnem delu glave spermatide in so v tem delu opaženi, dokler se spermatida ne sprost. To lahko kaže na funkcijo TBC pri sidranju spermatide v epitelij semenske cevke. Kasneje pride do fragmentacije membrane spermatide, ne pa tudi membrane Sertolijeve celice, znotraj katere se na dorzalni strani nahajajo TBC. Spremembe morfologije TBC kažejo na spremembo njihove funkcije med procesom spermiacije. Spermiacija se zaključi, ko se spermatida sprosti od Sertolijeve celice v lumen semenske cevke, kjer postane spermij. Zrele spermatide izgubijo kontakt s Sertolijevimi celicami. Večji del citoplazme spermatide se kondenzira in tvori rezidualno telo, ki ostane v epiteliju po sprostitvi spermatide. Spermatida je povezana z rezidualnim telescem preko podaljšane citoplazmatske zanke (Slika 6), ki se pretrga pred ali med procesom sprostitve spermatide v lumen. Po sprostitvi spermatide je rezidualno telo s strani Sertolijeve celice podvrženo fagocitozi. Rezidualno telo se zlije z lizosom Sertolijeve celice, pri čemer nastane fagolizosom. Verjetno je, da ravno to vodi v nastanek velike količine lipidov znotraj Sertolijevih celic s funkcijo regulacije dinamike bariere med testisom in krvnimi žilami.

Endocitoza komponent “mašinerije” spermiacije in fagocitoza rezidualnih teles med spermiacijo verjetno regulirata ostale aspekte Sertolijevih celic oziroma njihovo funkcijo ter tudi samo spermatogenezo.

Sproščanje spermatid v lumen semenske cevke je simultan proces. Sproščene spermatide nato odnese po tekočini semenske cevke do rete testisov in kasneje v nadmodek (O’Donnell in sod., 2011).



Slika 6: Proces spermiacije; v začetni fazi (VII) spermatida vsebuje veliko citoplazme, ki je kasneje (faza VIII) v znatni meri odstranjena (O’Donnell in sod., 2011).

Pri translokaciji spermatide sodelujejo mikrotubuli in motorni proteini znotraj Sertolijeve celice. Razpad ES in oblikovanje TBC sta povezana procesa. Neodvisni mehanizmi modulirajo vsak proces, ki se simultano dogaja na dorzalni in ventralni strani glave spermatide. Ti mehanizmi vključujejo lokalno regulacijo dinamike aktina, signalne transdukcijske poti in endokrine poti, vključene v transport proteinov in reciklacijo ter degradacijske poti.

Med procesom spermiacije lahko pride do številnih napak, najbolj pogosta pa je neuspešna sprostitev spermatide od Sertolijeve celice. Spermatide, ki se ne sprostijo ali pa se izmaknejo in ne pridejo v lumen semenske cevke, so fagocitirane s strani Sertolijevih celic. Za določitev faze, v kateri je prišlo do prekinitve uspešne spermiacije, se uporabljajo

imunohistokemične analize. V primeru, da zadržane spermatide nimajo prisotnih struktur ES in nimajo velike količine citoplazme, so zaključile zgodnjo fazo spermiacije (vključujoč oblikovanje TBC in preoblikovanje citoplazme), vendar sprostitvev v lumen ni bila uspešna. Nasprotno, prisotnost ES in prebitek citoplazme zadržane spermatide, kaže na napako pri tvorbi TBC, razpadu ES in/ali pri preoblikovanju spermatide.

Napake pri spermiaciji vodijo v neplodnost moškega. Če v ejakulatu ni prisotnih spermijev, kljub normalnemu številu podaljšanih spermatid v testisih, govorimo o azospermiji. Pojav fagocitoze poznih spermatid je pogost odgovor testisov na različne motilce (reprodukcijske toksine), ki vplivajo na delovanje hormonskega sistema.

Napake v spermiaciji se lahko kažejo tudi kot abnormalnosti morfologije spermatid, ki so sproščene v lumen, odvisno od tega, kdaj in kje v procesu spermiacije pride do napake; zgodaj v spermiogenezi ali v kasnejših fazah zorenja spermatid. Napake v spermiaciji imajo neugoden vpliv na razvoj germinalnih (spolnih) celic in povzročajo spremembe v signalizacijskih poteh v Sertolijevih celicah oziroma napake v fagocitiranju rezidualnih telesc, kar nadalje vpliva na samo funkcioniranje Sertolijevih celic in pripelje do povečanega fagocitiranja spermatidnih celic. Napake v spermiaciji so navadno znak, da v testisih nekaj ni v redu.

Spermiacija se dogaja pod vplivom testikularnih hormonov. FSH in androgen vplivata na receptorje v Sertolijevih celicah in sta glavna endokrina regulatorja spermiacije. Delujeta na različne signalne poti znotraj Sertolijevih celic in imata neodvisen vpliv na spermatogenezo. Sodelujeta pri kontroli preživetja zgodnjih spolnih celic in pri spermiaciji. Vpliv okoljskih dejavnikov, toksinov in endokrinih motilcev vpliva na proces spermiacije ter količino in kakovost produciranih spermijev. Napake v spermatogenezi, ne glede na to ali gre za eksogene ali genetske vzroke, vplivajo na število spermijev v ejakulatu in se lahko pojavijo v obliki azospermije, oligospermije itd. (O'Donnell in sod., 2011).

V primeru, da neplodni moški v semenskem izlivu nima spermijev, androlog pridobi spermije iz testisov. Spermiji iz testisa so zaradi nezrelosti slabše gibljivi ali negibljivi. Z negibljivimi spermiji so rezultati zunajtelesne oploditve slabši kot z gibljivimi spermiji. Poleg tega pride šele kasneje v nadmodku do nadaljnega dozorevanja jedra spermija. Kompleks DNK-protamini se stabilizira z disulfidnimi mostički. Med potjo skozi nadmodek se spremeni kemična in fizikalna zgradba lipidov v plazmalemi spermija (Virant-Klun in sod., 2002). V tkivu testisov so lahko spermiji zelo maloštevilni in je potrebnih več ur, da najdemo dovolj spermijev za izvedbo zunajtelesne oploditve na jajčnih celicah (Virant-Klun, 2004).

Spermiacija zahteva efektiven razpad strukture ES, ki omogoča translokacijo spermatide v spermatogenezi. Integrinske adhezijske povezave ohranjajo tesno povezavo spermatide

med razpadom ES. To omogoča, da Sertolijeva celica drži glavo spermatide in jo izteguje v lumen semenske cevke, ko je odvečna citoplazma spermatide odstranjena. Kompozicija teh adhezijskih povezav se spreminja med spermiacijo. Nekateri adhezijski proteini so opaženi le ob začetku spermiacije, drugi ostajajo v stiku med spermatido in Sertolijevo celico med fazo elongacije. Nekaj proteinskih podskupin je odstranjenih skupaj z odstranitvijo ES. Nekateri adhezijski proteini ostajajo prisotni do sprostitve spermatide v lumen semenske cevke in tudi sodelujejo pri tem koraku. Spermiacija je eden izmed zadnjih korakov zorenja v procesu spermatogeneze in vključuje končno oblikovanje glave, odstranitev citoplazme ter pomembno vpliva na morfologijo spermija. Razumevanje tega procesa je pomembno za implikacije optimizacije plodnosti pri moških (O'Donnell in sod., 2011).

2.3 SPERMIOGRAM

Kakovost semena pri moškem ocenimo že, ko se odločamo za način oploditve z biomedicinsko pomočjo pri neplodnem paru. Na osnovi spermioograma se odločimo bodisi za klasičen postopek zunajtelesne oploditve (IVF) ali neposreden vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI). Laboratorijska ocena kakovosti semena, spermioogram, se opravi v androloškem laboratoriju in vključuje oceno volumna semena, pH vrednost, viskoznost in barvo semenskega izliva ter oceno koncentracije, števila, gibljivosti, morfologije in vitalnosti spermijev. Oцени se tudi prisotnost levkocitov, okroglih celic (predvsem germinalnih celic), aglutinacijo spermijev in prisotnost protiteles proti spermijem v semenskem izlivu (Virant-Klun in sod., 2002). Z različnimi testi, predvsem s testom MAR (angl. *Mixed Agglutination Reaction*), lahko dokažemo prisotnost protiteles v semenskem izlivu, njihovo vrsto in titer. Kakovost semena ocenimo tudi na dan izvedbe postopka zunajtelesne oploditve (Virant- Klun in sod., 2002).

Spermioogram je standardizirana preiskava. Po merilih svetovne zdravstvene organizacije (Preglednica 1), naj bi bilo v semenu zdravega moškega 15 milijonov ali več spermijev na ml, od tega vsaj 40 % gibljivih spermijev in 4 % ali več spermijev z normalno morfologijo. Glede na slabšo kvaliteto semena ločimo različne vrste moške neplodnosti. Velikokrat so nepravilnosti v kakovosti semena med seboj povezane. Po striktnih Krugerjevih merilih (Kruger in sod., 1986) mora biti v semenu plodnega moškega vsaj 14 % spermijev z normalno morfologijo. Če je teh manj kot 14 %, je to nenormalno in je povezano s slabšo sposobnostjo oploditve jajčne celice. Če je odstotek morfološko normalnih spermijev nižji od 4 % gre za resne morfološke napake in zelo verjetno nezmožnost oploditve.

Glede oblike in velikosti glave, vratu, srednjega dela in repa so merila skladna. Glava mora biti ovalna, 4,0 do 5,0 μm dolga in 2,5 do 3,5 μm široka. Akrosomski del mora biti dobro definiran in mora predstavljati 40 do 70 % površine glave. Srednji del mora biti širok manj kot 1 μm in v osi pritrjen na glavo ter dolžine približno ena in pol krat velikosti glave.

Citoplazmatski ostanek je lahko velik največ za polovico velikosti normalne glave. Rep mora biti raven, ožji kot srednji del in dolg približno 45 μm .

Preglednica 1: Referenčne vrednosti za kakovost semena (World Health Organization, 2010)

PARAMETER	NAJNIŽJA REFERENČNA VREDNOST
Volumen semena (ml)	1,5 (1,4–1,7)
Skupno število spermijev (10^6 na ejakulat)	39 (33–46)
Koncentracija spermijev (10^6 na ml)	15 (12–16)
Giblјivost spermijev (progresivna + neprogresivna, %)	40 (38–42)
Progresivna giblјivost spermijev (%)	32 (31–34)
Vitalnost (živi spermiji, %)	58 (55–63)
Normalna morfologija spermijev (%)	4 (3,0–4,0)
OSTALE MEJNE VREDNOSTI	
pH	$\geq 7,2$
Levkociti v semenu (10^6 na ml)	$< 1,0$
MAR test (giblјivi spermiji z adherentnimi delci, %)	< 50
"immunobead" (giblјivi spermiji z vezanimi imuno kroglicami, %)	< 50
Cink (μmol /ejakulat)	$\geq 2,4$
Fruktoza (μmol /ejakulat)	≥ 13
Glukozidaza (mU/ejakulat)	≥ 20

2.4 VRSTA MOŠKE NEPLODNOSTI IN VZROKI

Neploidnost prizadane 15 do 20 % parov v reprodukcijskem obdobju. Od tega se neploidnost pri moških pojavlja pri približno polovici teh parov. Vzroki moške neploidnosti so lahko povezani z mikrolecijami kromosoma Y, nepravilnim številom kromosomov in drugimi genetskimi nepravilnostmi, vendar v manjši meri. Pri večini primerov je vzrok neploidnosti neznan. Med možnimi negenetskimi vzroki so naslednji:

- kriptorhizem (vraščeni oziroma nespuščeni testisi v otroštvu),
- obstrukcija ejakulatornih duktov,
- imunološke motnje (protitelesa proti spermijem),
- okužbe (vnetje testisov ali nadmodka, vnetje sečnice),
- vaskularne abnormalnosti (variokokela),
- abnormalnosti v endokrinem hormonskem sistemu (prirojena adrenalna hiperplazija, pomanjkanje hormona FSH in hiperprolaktinemija, pomanjkanje

hipotalamičnega sproščevalnega hormona gonadotropinov (GnRH) – Kallmanov sindrom),

- rak mod, kemoterapija, radioterapija,
- izpostavljenost toksičnim snovem (Silber in Disteche, 1993),
- pregrevanje testisov (šoferji itd.),
- nezdrav način življenja (jemanje steroidnih prepatov, drog, prekomerno uživanje alkohola itd.).

Med genetske vzroke moške neplodnosti spadajo strukturne (npr. mikrodelecije kromosma Y) in številčne (npr. sindrom Klinefelter) nepravilnosti spolnih in avtosomnih kromosomov ter genske mutacije (npr. cistična fibroza). Negenetski vzroki moške neplodnosti so, kot smo že omenili, retiniran testis ali kriptorhizem (nespuščeno modo), variokokela (razširjene žile venskega pleteža), vnetje testisa, nadmodka, sečnice, hormonski vzroki, imunski vzroki (protitelesa proti spermijem, ki povzročajo zlepljanje oziroma aglutinacijo spermijev), spolne motnje, motnje erekcije in ejakulacije, rak moda, sindrom Kartagener (negibljive migetanke oziroma negibljivi spermiji), način življenja, zdravila, sevanja in strupi, onesnaženo okolje ter psihološki stres (Virant-Klun in sod., 2002).

Posledično je najpogostejši vzrok moške neplodnosti slaba kakovost semena (Preglednica 2). Moški so neplodni zaradi oligozoospermije (O), astenozoospermije (A) ali teratozoospermije (T), ki so pogosto med seboj povezane (oligoastenoteratozoospermija – obolenje OAT). Moška neplodnost je lahko tudi posledica nekrozoospermije, pri kateri je vitalnost spermijev zelo slaba in je večina spermijev v semenskem izlivu mrtvih. Najtežja oblika moške neplodnosti je azoospermija, ko v semenskem izlivu ni spermijev. Ločimo obstruktivno in neobstruktivno azoospermijo. Prva je lahko posledica prirojene odsotnosti semenovodov ali pa nastane zaradi aplazije med testisom in nadmodkom. Spermatogeneza je sicer normalna. Pri neobstruktivni azoospermiji pa gre za moteno spermatogenezo, ki se kaže kot sindrom Sertolijevih celic (SCOS), zastoj v dozorevanju spermijev ali hipospermatogenezi.

Preglednica 2: Nomenklatura neplodnosti glede na kakovost semena (World Health Organization, 2010)

PATOLOGIJA	OPIS PATOLOGIJE
Aspermija	Odsotnost semena (ali retrogradna ejakulacija)
Astenozoospermija	Delež progresivno gibljivih spermijev pod mejnimi referenčnimi vrednostmi
Astenoteratozoospermija	Delež progresivno gibljivih spermijev in delež morfološko normalnih spermijev pod mejnimi referenčnimi vrednostmi
Azoospermija	V ejakulatu ni prisotnih spermijev

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Nomenklatura neplodnosti glede na kakovost semena

PATOLOGIJA	OPIS PATOLOGIJE
Kriptozoospermija	Izjemno redki spermiji, odsotnost spermijev v svežem preparatu, vendar spermiji opaženi v centrifugirani usedlini
Haemospermija	Prisotnost eritrocitov v ejakulatu
Leukospermija	Prisotnost levkocitov v ejakulatu
Nekrozoospermija	Majhen delež živih in visok delež negibljivih (mrtvih) spermijev v ejakulatu
Oligoastenozoospermija	Število spermijev (koncentracija) in delež gibljivih spermijev pod mejnimi referenčnimi vrednostmi
Oligoastenoteratozoospermija	Število spermijev (koncentracija), delež gibljivih in morfološko normalnih spermijev pod mejnimi referenčnimi vrednostmi
Oligoteratozoospermija	Število spermijev (koncentracija) in delež morfološko normalnih spermijev pod mejnimi referenčnimi vrednostmi
Oligozoospermija	Število spermijev (koncentracija) pod mejnimi referenčnimi vrednostmi
Teratozoospermija	Delež morfološko normalnih spermijev pod mejnimi referenčnimi vrednostmi

Kot je bilo že omenjeno, lahko neplodnost povzročijo spremembe v številu ali zgradbi spolnih kromosomov.

Posledica nadštevilnega kromosoma X (47, XXY) je sindrom Klinefelter in gonade, v katerih se gamete ne razvijejo do končnih razvojnih stopenj. Testisi takih moških so približno 5 do 10-krat manjši kot običajno, kljub temu pa tvorijo zadostno količino moških spolnih hormonov za normalen razvoj sekundarnih spolnih znakov. Pri mozaičnem sindromu Klinefelter v tkivu testisa lahko najdemo zelo redke spermije, pri nemozaičnem sindromu Klinefelter pa spermijev ni. Naslednja nepravilnost, gonadna disgenezija s formulo 45, X0 ima za posledico azoospermijo. Tudi moški s kariotipom 47, XYY so lahko neplodni.

Med nepravilnostmi v zgradbi kromosomov so najpogostejše mikrodelecije. Mikrodelecije kromosoma Y se pojavljajo pri 5 do 10 % neplodnih moških in povzročajo obolenje OAT ali azoospermijo.

Včasih pri pacientu ne najdemo semenovoda (angl. *congenital absence of vas deferentes* - CABVD). Motnja je genetsko pogojena, prirojena in večkrat povezana z mutacijami gena *CFTR* (angl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Pri neplodnih moških so lahko prisotne tudi mutacije gena *ACE* (angl. *Angiothensin Converting Enzyme*).

Po Ayhan in sod. (2014) je pri moških z mutacijo dveh avtosomnih recesivnih genov *TAF4B* in *ZMYND15* spermatogeneza ustavljena na stopnji okroglih spermatid. Nenormalna ponovitev trinukleotidov CAG na androgenskih receptorjih je večkrat izražena pri neplodnih kot plodnih moških. V semenu takih moških je spermijev manj ali jih ni, sekundarni spolni znaki pa so primerno razviti.

Kirurško lahko premostimo zaporo semenskih poti, kadar je neplodnost posledica npr. vnetnih sprememb (zalsti nadmodka) ali pa predhodne sterilizacije (vazektomije). Z operacijo lahko v modnik spustimo nespuščen testis ali odstranimo varikokelo. S kirurškim posegom, punkcijo ali biopsijo testisov pridobimo spermije iz nadmodka ali testisa in jih uporabimo v postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo. Pri moških z azospermijo lahko zaradi obstrukcija nadmodka ali iatrogene obstrukcije semenovodov kirurško popravimo genitalne poti, da se spermiji lahko sprostijo v semenski izliv (Virant-Klun in sod., 2002).

2.4.1 Nepravilnosti v morfologiji spermijev in semenskih cev

Izpostaviti želimo morfologijo spermijev kot enega ključnih dejavnikov izida postopka zunajtelesne oploditve. V androloških laboratorijih opažen zelo nizek odstotek morfološko normalnih spermijev v semenski tekočini pri nekaterih pacientih je pripeljal do izpopolnjevanja določanja morfologije spermijev kot orodja v klinični diagnostiki pacienta in tudi za napoved potenciala moške plodnosti pri *in vivo* oploditvi oziroma napovedi izida pri asistirani reprodukciji. Tako je poleg natančnih in striktnih pristopov oziroma uporabe obstoječih smernic ter doseganja visokih laboratorijskih standardov prišlo do uvedbe razredov in vzorcev nenormalne morfologije spermijev. To je iz kliničnega pogleda velikega pomena, tako pri določanju načina zdravljenja (na primer zaradi stresa, ki ga povzroči okužba moškega genitalnega trakta, ki se kaže z znatnim povečanjem deleža podolgovatih spermijev), kot tudi pri odločanju, katero tehniko oploditve z biomedicinsko pomočjo uporabiti (IVF oziroma ICSI) (Menkveld in sod., 2011).

Med nepravilnostmi glave spermija se pojavljajo (Slika 7):

- nepravilnosti akrosoma: majhen ali velik akrosom (manj kot 40 % ali več kot 70 % glave),
- strukturne nepravilnosti: hruškasta glava – piriform, zelo stanjšana glava na mestu, kjer je pritrjen rep ali po vsej dolžini ali v sredini, okrogla glava – globozoospermija,
- nepravilnosti površine: neovalna glava, vakuolizirana glava (prisotni več kot dve vakuoli),

- nepravilne dimenzije glave (premajhna ali prevelika),
- dvojna glava,
- dekapitacija (spermij brez glave) (Virant-Klun in sod., 2002).



Slika 7: Morfologija glave spermija; spermij z normalno glavo skrajno levo in ostalo spermiji z nepravilnostmi glave (Kloos, 2011)

Med nepravilnosti vratu in srednjega dela spermija prištevamo:

- kriv rep (vrat in rep tvorita kot 90°),
- nezrelost spermija s citoplazmatskim ostankom, ki obdaja bazalni del glave, srednji del ali rep (Virant-Klun in sod., 2002).

Nepravilnosti repa vključujejo:

- nepravilno vsaditev repa: rep izrašča iz nepravilnega dela glave,
- zvit rep: zvit okrog glave ali okrog vse celice,
- rep pod kotom 90° glede na osrednjo os glave,
- več repov, ki izraščajo iz iste glave (Virant-Klun in sod., 2002).

V vsakodnevni klinični praksi pri klasifikaciji morfoloških nepravilnosti spermijev v Androloškem laboratoriju Ginekološke klinike, Univerzitetni klinični center Ljubljana, upoštevajo naslednja merila: nepravilnosti glave (akrosomske nepravilnosti, nepravilnosti postakrosomskega predela – nepravilnosti jedra, vakuolizirano glavo, glavo z dvema jedri, dve glavi in nepravilne velikosti glave), nepravilnosti srednjega dela (citoplazmatski ostanek in podaljšan vrat), nepravilnosti repa (različne dolžine, zavitost, več repov) in pojav nezrelih razvojnih oblik (spermatociti in spermatide) (Virant-Klun in sod., 2002). Ugotovljeno je bilo, da morfolologija spermija pomembno vpliva na razvoj zarodka do razvojne stopnje blastociste in na njeno kakovost. Zona pellucida jajčne celice predstavlja selektivno bariero za nepravilno oblikovan spermij. Z uporabo metode ICSI se selektivni barieri zone pellucide izognemo in lahko dosežemo oploditev tudi s spermiji slabše kakovosti (Miller in Smith, 2001). Obstaja več različnih metod za izbor morfološko najbolj primernih spermijev za oploditev jajčnih celic v postopku zunajtelesne oploditve.

V tkivu testisa, pridobljenega za postopek zunajtelesne oploditve pri pacientih z azoospermijo, ocenimo prisotnost spermijev, a ne njihove morfologije. Oцени pa se morfologija semenskih cevč. Tkivo, pridobljeno s kontrolno biopsijo testisa pri moškem vsebuje 100 do 200 semenskih cevč, ki imajo premer 100 do 300 μm . Pri semenskih cevčah testisa ocenjujemo njihovo velikost in bazalno membrano. Pri odraslem moškem imajo semenske cevčke premer od 150 do 300 μm , bazalna membrana pa debelino do 7 μm in jo sestavlja notranja plast miofibroblastov, v 3 do 4 vrstah, ter zunanji obroč treh plasti fibroblastov. V testisu so ob bazalni membrani Sertolijeve celice in spermatogoniji, nato sledijo spermatociti I. reda, spermatociti II. reda, spermatide in spermiji, ki se izločijo v lumen cevčke, lahko pa ležijo tudi v vseh plasteh semenskega epitelija.

Poznane patološke spremembe semenskih cevč v testisu so:

- **tubularna hipoplazija**: cevčke so majhne, kot ob rojstvu in se ne večajo med puberteto. V njih so nezrele Sertolijeve celice in spermatogoniji;
- **hialinizacija bazalne membrane**: minimalna koncentrična zadebelitev notranje plasti s hialiniziranim, bledoeozinofilnim materialom, semenski epitelij je ohranjen;
- **tubularna skleroza**: popolna obliteracija svetline brez semenskega epitelija, v vzorcih testisov 60 % moških najdemo posamične sklerotične tubule kot posledico staranja oziroma aterosklerotičnih sprememb;
- **peritubularna fibroza**: zadebelitev miofibroblastne plasti kot posledica alkohola, toksinov, estrogena, progesterona in vnetnih sprememb intersticija. V težjih primerih bolezni testisov pride do popolne fibroze intersticija, ki skupaj s tubularno sklerozo predstavlja končni stadij propada testisov. Testisi so majhni, v serumu moškega so povišane koncentracije hormonov FSH in LH (Virant-Klun in sod., 2002).

2.4.1.1 Nepravilnosti kromosoma Y in neplodnost

Med genetskimi nepravilnostmi, povezanimi z neplodnostjo moškega, želimo izpostaviti nepravilnosti spolnega kromosoma Y. Pomembno je ugotavljanje kromosomske slike oziroma kariotipa pri neplodnih moških, saj se pri 12,6 % moških z azoospermijo in 1,6 % moških z oligozoospermijo pojavljajo aberacije spolnih kromosomov. Pri azoospermikih prevladujejo nepravilnosti spolnih kromosomov (mikrodelecije kromosoma Y, Klinefelterjev sindrom), pri oligozoospermiji pa nepravilnosti somatskih kromosomov (Robertsonove in recipročne translokacije) (Virant-Klun in sod., 2002).

Diagnoza neplodnosti, povezane s kromosomom Y, se včasih postavi pri moških z azospermijo ali oligospermijo in/ali nenormalno morfologijo spermijev oziroma njihovo gibljivostjo, kjer so bili izločeni drugi vzroki neplodnosti. Kromosomske mikromreže ali rutinske citogenetske preiskave pokažejo nepravilnosti kromosomov pri 5 do 10 % teh moških. Molekularni testi pokažejo mikrodelecije dolge ročice kromosoma Y pri ostalih 5 do 13 % teh pacientov. Nosečnost se v takšnih primerih doseže z zunajtelesno oploditvijo s pomočjo metode ICSI, s spermiji iz ejakulata oziroma s spermiji, pridobljenimi z biopsijo testisov (v primeru azospermije) (Silber in Disteche, 1993).

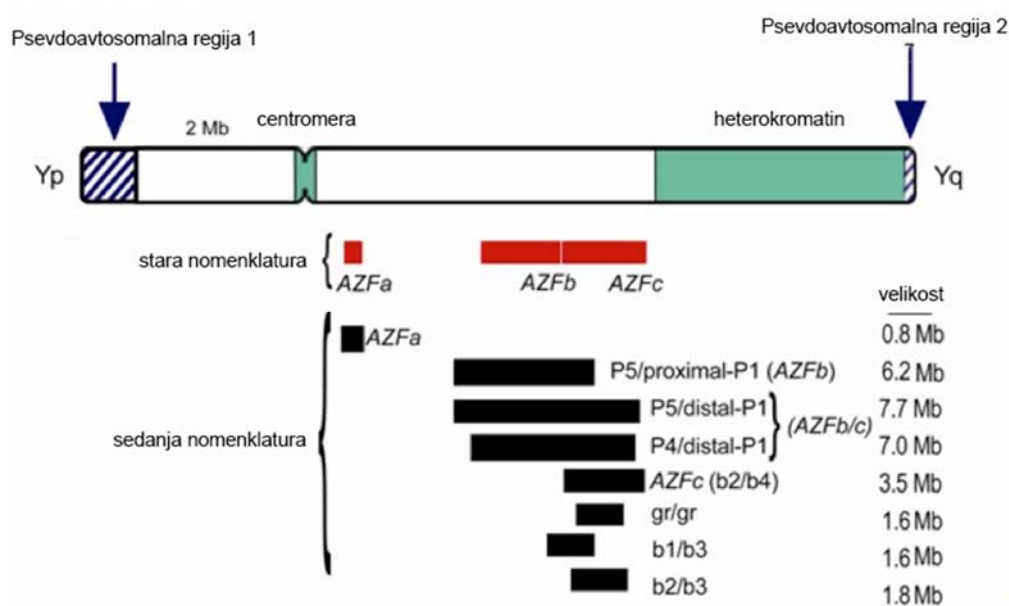
Kromosom Y je eden najmanjših kromosomov v človeškem genomu in predstavlja približno 2 do 3 % haploidnega genoma. Citogenetske študije so pokazale, da pri kromosomu Y prepoznamo različne regije, psevdosomalni del (razdeljen na področji PAR1 in PAR2) in evkromatinsko ter heterokromatinsko regijo. V primerjavi z drugimi kromosomi ima kromosom Y malo genov, pri čemer več kot 50 % zaporedja sestavljajo ponavljajoči elementi. Pseudoavtosomalna regija PAR1 se nahaja na končnem delu kratke ročice Yp, PAR2 pa na konici daljše ročice Yq. PAR1 in PAR2 zajemata približno 2600 in 320 kb DNK. Geni, ki se nahajajo znotraj PAR so dedovani na enak način, kot avtosomni geni. Evkromatinska regija se nahaja distalno od PAR 1 in sestoji iz kratke ročice paracentromerne regije, centromere ter dolge ročice paracentromerne regije. Heterokromatin obsega distalni Yq oziroma področje Yq12. To regijo sestavljata predvsem dve družini ponavljajočih se sekvenc, DYZ1 in DYZ2; regija vsebuje približno 5000 in 2000 kopij vsake družine. Ker PAR1 in PAR2 predstavljata 5 % celotnega kromosoma, je večina dolžine kromosoma Y tako imenovani ne-rekombinantni Y (NRY). Ta vključuje evkromatinsko in heterokromatinsko regijo (Quintana-Murci in Fellous, 2001).

Približno 5 do 10 % moških z nepojasnjeno neplodnostjo, povezano z azospermijo, oligozoospermijo in/ali nepravilnostmi v morfologiji oziroma gibljivosti spermijev, ima kromosomske nepravilnosti, predvsem te, ki vključujejo spolne kromosome, vendar lahko tudi avtosomalne. Nepravilnosti so lahko numerične (npr. Klinefelterjev sindrom: 47, XXY) ali strukturne (npr. uravnotežena avtosomna translokacija). Rutinske citogenetske preiskave z G – barvanjem in fluorescentno *in situ* hibridizacijo (FISH) z uporabo sond, specifičnih za gene na kromosomu Y, lahko pokažejo nekatere nepravilnosti v strukturi kromosoma Y, kadar so prisotne:

- terminalne delecije Yq, ki vključujejo heterokromatinsko področje Yq12, na koncu dolge ročice kromosoma Y. Potrebno pa je upoštevati, da so psevdodicentrični kromosomi Y lahko nepravilno določeni kot terminalne delecije;
- ostale bolj kompleksne preureditve kromosoma Y, ki vodijo v delecije na dolgi ročici. Kot primer navajamo psevdodicentrični kromosom Y (izodicentrični ali

nefluorescenčni Y), ki je lahko posledica delecije dela dolge ročice in podvojitev kratke ročice ter proksimalne dolge ročice.

Tri različne regije ("*Azoospermia factor*" regije), AZFa, AZFb in AZFc, ki segajo od proksimalnega do distalnega Yq, so potrebne za normalno spermatogenezo pri človeku. Delecije v regiji AZFa se pri neplodnih moških pojavljajo manj pogosto in so povezane z nepravilnimi testikularnimi fenotipi, s skoraj popolno odsotnostjo germinalnih celic (Foresta in sod., 2000). Vsaka regija AZF vsebuje več genov, ki igrajo pomembno vlogo pri različnih stopnjah spermatogeneze. Verjetno je, da bodo v prihodnosti raziskave teh genov pri neplodnih moških pokazale bolj natančne povezave med genotipom in fenotipom. Kakorkoli, polimorfizmi in prisotnost več kopij večine genov na kromosomu Y, povezanih s plodnostjo, otežujejo natančno določitev njihove vloge. Regiji, ki sta bili sprva določeni kot posamezni regiji AZFb in AZFc sta se kasneje izkazali za delno prekrivajoči se regiji (Slika 8) (Silber in Disteche, 1993).



Slika 8: Shematični prikaz kromosoma Y, ki kaže približen položaj predhodno opredeljenih regij AZFa, AZFb in AZFc ter položaj ponavljajočih se izbrisov trenutno opredeljene nomenklature na podlagi spremljajoče Palindromne ponovitve. Označeni so kratki krak (Yp), centromere, dolgi krak (Yq) (vključno s polimorfnim pasom heterokromatina Yq12 spremenljive dolžine) in psevdosomalnima regijama 1 in 2 (Silber in Disteche, 1993).

Od teh regij imajo delecije v AZFa najbolj negativen vpliv na spermatogenezo, s posledicami popolne odsotnosti spermijev in klinično diagnozo sindroma Sertolijevih celic (SCOS, *angl. Sertoli-cell-only-syndrome*). Regija AZFa vključuje gena *DBY*, znanega tudi kot "*DEAD Box*" *Helikaza 3*, vezana na kromosom Y (*DDX3Y*) in *USP9Y*, *Ubikvitin Specifična Peptidaza 9*, vezana na kromosom Y. Mutacije in delecije gena *USP9Y*

povzročajo hipospermatogenezo, a so opažene tudi pri plodnih moških. Gen *DDX3Y* ima pomembnejšo vlogo pri plodnosti moških. Kodira ATP-odvisno RNK helikazo, ki je del dobro ohranjene družine DDX3 (DEAD Box Helicase family), z vlogo v RNK metabolizmu in regulaciji translacije. *DDX3Y* ima podobno kot veliko drugih genov na kromosomu Y tudi homologni gen na kromosomu X, *DDX3X* oziroma *DBX*, z 91,7 % homologijo. Medtem ko so prepisi obeh genov izraženi v zarodni liniji celic, je *DDX3Y* protein omejen na predmejotične spermatogonije, *DDX3X* pa je v pomejotičnih spermatidah. Domnevno naj bi funkcija proteina *DDX3Y* izhajala iz vloge *DDX3X* pri regulaciji razvoja zarodnih celic. Njegova delecija je primarni razlog za azoospermijo pri moških z AZFa delecijami (Ramathal in sod., 2015). Gen *DBY* (*DDX3Y*) je pri neplodnih moških pogosto izbrisan, njegova odsotnost pa je razlog za hude napake v spermatogenezi, ki vodijo v znatno zmanjšano število germinalnih celic ali celo do njihove popolne odsotnosti. *DBY* producira dolg transkript (prepis), ki je vseprisoten in izražen poleg krajšega transkripta, ki se izraža le v testisih, kar kaže na specifično vlogo *DBY* pri procesu spermatogeneze (Foresta in sod., 2000). Ramathal in sod. (2015) sklepajo na dva možna modela vloge *DDX3Y* v razvoju linije germinalnih celic. Prva možnost je, da *DDX3Y* direktno aktivira izražanje genov metabolizma RNK, ki imajo vlogo pri regulaciji translacije in transkripcije. Lahko da *DDX3Y* preko RNK helikazne domene sodeluje pri uravnavanju translacije z vezavo na male ribosomalne RNK ali mRNK molekule v citoplazmatskih p-granulah (specifične citoplazmatske strukture germinalnih celic, ki vsebujejo RNK in proteine, potrebne za pravilen razvoj germinalnih celic). Drugi domnevni model je vloga *DDX3Y* preko regulacije transkripcije. *DDX3Y* je za testise specifičen gen, ki se nahaja na AZF regiji kromosoma Y, z vlogo pri zgodnji regulaciji spermatogeneze (Ramathal, in sod., 2015).

Raziskave so pokazale, da je SCOS običajno povezan z AZFa delecijo; ni povzročen s samim izbrisanom *USP9Y*, ampak je za to potrebna tudi delecija v sosednjem genu, *DDX3Y*, da se izrazi fenotip azoospermije. Popolen izbris regije AZFa tako vključuje izgubo dveh genov, *USP9Y* in *DDX3Y*, ter povzroči veliko slabši fenotip kot mutacija samega gena *USP9Y*.

Vmesne ali terminalne delecije, ki vključujejo AZFb in/ali AZFb+c, so posredovane preko rekombinacij med palindromnimi ponovitvami, bodisi P5/proxP1, P5/distP1 ali P4/distP1. Te delecije so redke in ponavadi povzročijo hudo azoospermijo. Delne delecije AZFb, z odstranitvijo P4 palindroma povzročijo zmanjšanje zorenja spermatocitov. Vmesne ali terminalne delecije, ki vključujejo le AZFc, so posredovane z rekombinacijo med b2/b4 palindromskimi ponovitvami in imajo za rezultat različne fenotipe neplodnosti, azoospermijo, SCOS ali hudo oziroma blago obliko oligozoospermije.

Pri moških z neplodnostjo, povezano s kromosomom Y, ponavadi ni vidnih očitnih simptomov, včasih se lahko opazi majhne testise. Pri posameznikih z Yq delecijami, ki se

nahajajo blizu centromere, v regiji, ki vključuje domnevni gen kontrole rasti, *GCY*, se lahko pojavi majhna rast. Nenormalna rast je lahko tudi posledica skrite spremembe v številu kopij v regiji PAR, ki lahko vpliva na *SHOX* gen (angl. *short stature homeobox*), ki je esencialen za rast skeleta in ima pomembno vlogo pri razvoju kosti ramen in nog. Vendar so ti primeri redki. Delecije, omejene na regije AZF, niso povezane z drugimi fenotipi, le z neplodnostjo.

Neplodnost, povezana s kromosomom Y, je torej posledica mikrolecije ali preureditve (na primer psevdodicentrični kromosom Y) dolge ročice Yq v AZF regiji, v povezavi z delecijo več genov ali redkejšo samostojno gensko nepravilnost *USP9Y* v AZFa regiji (Silber in Disteche, 1993).

2.5 OPLODITEV

Oploditev je proces združitve spermija in jajčne celice. Pri združitvi obeh haploidnih spolnih celic nastane ena diploidna celica, zigota, ki se razvija v zarodek (Purves in sod., 2003). Oploditev je nadzorovan proces, s katerim se začne razvoj novega individua, z genom, ki izhaja od obeh staršev. Gre za prenos genov na potomce in iniciacijo reakcij v citoplazmi jajčne celice, ki omogočajo začetek razvoja zigote. Ko oploditev vodi v nastanek novega organizma, govorimo o reprodukciji. Dogodke in procese, povezane z oploditvijo, sestavljajo štiri osnovni koraki:

1. Povezava in prepoznavanje med jajčno celico in spermijem ter preprečitev združitve spolnih celic različnih vrst.
2. Reguliran vstop enega spermija v jajčno celico in kontrolirana preprečitev vstopa ostalim spermijem.
3. Fuzija genetskega materiala spermija in jajčne celice (nastanek diploidnega jedra zigote).
4. Aktivacija metabolizma jajčne celice in s tem začetek razvoja (Gilbert, 2014).

Med jajčno celico in spermijem obstaja kompleksna komunikacija. Preden pride do fuzije spermija s plazemsko membrano jajčne celice, se mora ta prebiti skozi zaščitni plasti, ki obdajata jajčno celico. Jajčna celica sesalcev je obdana s kumulusom, ki ga sestavlja masa folikularnih celic v želatinoznem matriksu. Pod kumulusom se nahaja glikoproteinska ovojnica jajčne celice, imenovana zona pellucida. Spermij pri sesalcih postane metabolično aktiven, ko se nahaja v ženskem reprodukcijskem traktu in je ob srečanju z jajčno celico sposoben akrosomske reakcije. Aktiviran spermij se lahko prebije skozi kumulus in pride v interakcijo s zono pellucido. Ob kontaktu se vrstno specifični glikoproteini zone pellucide vežejo in prepoznavajo molekule na glavi spermija. Vezava sproži akrosomsko reakcijo spermija in sprostitve akrosomskih encimov, ki omogočijo pot spermija skozi zono pellucido. Ko glava spermija doseže plazemsko membrano jajčne celice, pride do adhezije

in fuzije spermija ter jajčne celice. Pri sesalcih vstop spermija ne povzroči znatne spremembe v membranskem potencialu, sproži pa fosfatidil-inozitol-bifosfat (PIP₂), sekundarni sporočevalni sistem jajčne celice (Purves in sod., 2003). Aktivacija fosfolipaze C povzroči hidrolizo PIP₂, pri čemer nastaneta diacilglicerol in inozitoltrifosfat (IP₃). IP₃ povzroči sprostitvev kalcija iz endoplazmatskega ritikuluma jajčne celice v citoplazmo. Iz endoplazmatskega ritikuluma se sprostijo kalcij, s čimer pride do zlitja kortikalnih granul s plazemsko membrano jajčne celice. Pride do kortikalne reakcije, pri čemer encimi kortikalnih granul uničijo molekule v zoni pellucidi, ki prepoznavajo in vežejo spermije – sprožena je počasna blokada polispermije. Zvišan nivo citoplazmatskega kalcija prav tako aktivira metabolizem jajčne celice in je znak za zaključek mejoze. Intracelularni pH v jajčni celici naraste, poveča se poraba kisika, stimulirana je sinteza proteinov in sinteza DNK. Zigota je pripravljena na prvo celično delitev (Purves in sod., 2003).

2.5.1 Zunajtelesna oploditev

Zunajtelesna oploditev se izvaja v Laboratoriju za oploditev z biomedicinsko pomočjo Ginekološke klinike, Univerzitetni klinični center Ljubljana.

Kadar je kakovost semena pri moškem normalna, se izvaja klasični postopek zunajtelesne oploditve (IVF) z inseminacijo jajčnih celic partnerice. Kadar pa je kakovost semena nenormalna oziroma poslabšana ali pa gre celo za spermije iz testisa, zunajtelesno oploditev izvajamo s postopkom ICSI.

2.5.1.1 Postopek ICSI

Ob slabi kakovosti semena, predhodnih neuspešnih klasičnih zunajtelesnih oploditvah (IVF), ob imunološkem dejavniku moške neplodnosti ali ob odsotnosti spermijev v ejakulatu oziroma spermijih iz testisa v primeru azospermije, izvedemo pri paru postopek neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (angl. *Intracytoplasmic sperm injection* – ICSI) (Virant-Klun, 2004). Z začetkom uporabe te metode so postale ozdravljive tudi najtežje oblike moške neplodnosti zaradi poslabšane kakovosti spermijev ali celo s spermiji iz testisa, saj postopek omogoča oploditev jajčnih celic tudi z ejakuliranimi spermiji slabe kakovosti ali spermiji iz testisa (Virant-Klun in sod., 2002). Pri moških z obstruktivno azospermijo se uporablja predvsem kirurški pristop aspiracije spermijev iz nadmodka. Odstotek nosečnosti po postopku ICSI s spermiji iz nadmodka je primerljiv z odstotkom nosečnosti pri postopku ICSI s spermiji iz ejakulata. Pri moških z obstruktivno azospermijo spermatogeneza poteka normalno. Pri večini azospermikov pa gre za neobstruktivno azospermijo z moteno spermatogenezo, pri kateri je potrebna kirurška ekstrakcija spermijev iz testisov – TESE (angl. *testicular sperm extraction*) ali

mikro-TESE (Tanaka in sod., 2015). Spermiji, izolirani iz testisov, niso popolnoma zreli in so zato slabše gibljivi ali negibljivi. Zrelost spermijev pomembno vpliva na razvoj zarodka. Nezreli spermiji imajo nepravilnosti kromatina, predvsem nepravilni nukleoproteinski vzorec (histoni namesto protaminov, nepravilni proteinski vzorec) in porušeno integriteto DNK (enovijačna, fragmentirana DNK). To zmanjšuje njihovo oploditveno sposobnost (Virant-Klun in sod., 2002).

Metodo ICSI izvedemo tako, da v vsako jajčno celico pod posebnim, invertnim mikroskopom, s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja mikroinjiciramo po en spermij (Slika 9).



Slika 9: Izvedba neposrednega vnosa spermija (puščica) v citoplazmo jajčne celice (postopek ICSI) z mikroinjekcijsko pipeto (Virant-Klun in sod., 2002)

2.5.1.2 Pridobitev zrelih jajčnih celic

Jajčne celice v postopku zunajtelesne oploditve pridobimo po predhodnem kontroliranem hormonskem vzpodbujanju jajčnikov, namen katerega je, da v jajčnikih dozori več foliklov in jajčnih celic, ki jih nato ultrazvočno odvzamemo oziroma aspiriramo iz jajčnikov za postopek zunajtelesne oploditve. Zrelost jajčne celice je lahko ocenjena po videzu kompleksa jajčna celica – kumulus. Jajčna celica v metafazi II je predovulacijska jajčna celica, aspirirana iz Graafovega folikla in sposobna oploditve. Lahko je zrela jajčna celica, opazna kot svetla kroglica in sposobna oploditve (celice žarkaste korone so redke in raztresene, ločene od jajčne celice, kumulus je obilen). Luteinizirana jajčna celica, ki je zelo svetla, se redko oplodi. Prepoznamo jo po razpadlem kumulusu in tvorbi želatinaste mase okrog jajčne celice. Pri atretični jajčni celici, ki je zelo temna, citoplazma razpada, celice granulosa pa so fragmentirane. Gre za propadajoče jajčne celice, ki se postopno razgrajujejo. Propadanje je posledica apoptoze, ki je genetsko pogojena. Zrela jajčna celica

še nima zaključene zoritvene delitve, mejoze. V zreli jajčni celici je mejoza zaustavljena v metafazi II druge mejotske delitve, ki se zaključi šele po oploditvi. Zrelost jajčne celice vključuje tako zrelost jedra, kot tudi zrelost citoplazme. Zrelo jajčno celico prepoznamo po majhnem okroglem mehurčku pod cono pelucido, polarnem telesu. V foliklu oziroma aspirirani folikularni tekočini se okrog jajčne celice nahajajo celice granuloze, ki so okrog jajčne celice oblikovane kot žarkasta korona (lat. *corona radiata*). Optimalna zrelost jajčne celice je dosežena, ko so celice žarkaste korone okrog jajčne celice razširjene, vendar se še držijo jajčne celice. Kumulus je puhasta, razširjena viskozna masa (Virant-Klun, 2004).

Znano je, da je v naravnem ciklusu ženske mejotska zrelost jajčne celice povezana s povečanjem stopnje razpršenosti kumulusne mase in s tvorbo viskoznega medceličnega matriksa. Kumulus zrele jajčne celice je povečan ter razpršen in njegov matriks pospeši izluščanje jajčne celice iz folikla ob ovulaciji. Skupaj s kumulusnimi celicami (celice granuloze in teke) ta matriks ustvarja primerno okolje za prodiranje spermijev do jajčne celice in oploditev. Hialuronanska komponenta matriksa se namreč veže na proteinske receptorje PH-20 na površini spermija in mu tako olajša akrosomsko reakcijo (Čížek-Sajko in Vlasisavljević, 2002).

Ob ustreznem času po hormonskem vzpodbujanju jajčnikov je potrebno zrele jajčne celice ultrazvočno aspirirati iz foliklov s pomočjo ultrazvoka. V aspiratu oziroma folikularni tekočini se poišče jajčne celice in se jih odvzame za postopek zunajtelesne oploditve. Folikularna tekočina je bogata mešanica proteinov, hormonov, rastnih substanc (citokinov), metabolitov in toksinov. V folikularno tekočino se te substance sproščajo po sekreciji celic granuloze ali z difuzijo iz krvne plazme. Nekatere od prisotnih substanc so pomembne za metabolizem folikla in za rast ter dozorevanje jajčne celice. V folikularni tekočini po ultrazvočni aspiraciji foliklov najdemo poleg jajčnih celic tudi celice granuloze. Celice granulozna pomagajo oceniti zrelost jajčne celice. Pri zrelih jajčnih celicah so običajno velike in dobro razpršene, medtem ko so pri nezrelih jajčnih celicah majhne in zbite skupaj (Virant-Klun in sod., 2002).

Kljub skrbnemu hormonskemu vzpodbujanju jajčnikov je lahko delež (do 10 %) pridobljenih jajčnih celic nezrel; lahko gre za profazo I nezrele jajčne celice z germinalnim veziklom (GV) ali metafazo I (MI) nezrele jajčne celice brez polarnega telesa. Nezrele jajčne celice nimajo naravne danosti oploditve.

Število pridobljenih jajčnih celic je odvisno od zrelosti in števila foliklov, dimenzij igle, s katero je izvedena ultrazvočna aspiracija, in od pritiska, s katerim izvajamo aspiracijo. Sindrom hiperstimulacije jajčnikov je edini resen zaplet uporabe zdravil oziroma hormonov za spodbujanje jajčnikov in sprožitev ovulacije. Sindrom lahko preprečujemo tudi z metodo zgodnje aspiracije foliklov. Iz enega jajčnika aspiriramo folikularno tekočino in s tem zmanjšamo koncentracijo hormonov v jajčnikih.

2.5.1.3 Pridobitev spermijev

Neploeden moški z zmanjšanim številom, slabo morfologijo ali slabo gibljivostjo spermijev (oligozoospermija, teratozoospermija, astenozoospermija, oligoastenoteratozoospermija) v ejakulatu odda seme z masturbacijo, tako kot moški z normalno kakovostjo semena (normospermiki). Pri neplodnih moških z azoospermijo ali s težjimi motnjami erekcije in ejakulacije je potrebno kirurško pridobiti spermije iz testisa ali epididimisa. Z uporabo ICSI (angl. *intracytoplasmic sperm injection*) se je začel tudi kirurški pristop pridobitve spermijev iz testisa in s tem možnost zdravljenja moške neplodnosti z azoospermijo ali motnjami erekcije. Iz tkiva testisov se pridobi le manjše število spermijev, ki se jih uporabi za mikroinjeciranje v jajčne celice z metodo ICSI. Na podlagi kliničnih, hormonskih in histoloških značilnosti skušamo čimbolje napovedati prisotnost spermijev v tkivu testisov. Le natančna ocena prisotnosti spermijev in dobra priprava tkiva prepreči negativne biopsije ali aspiracije in nepotrebno večkratno ponavljanje posega (Virant-Klun in sod., 2002). Tkivo testisa se odvzame z diagnostično biopsijo in zamrzne. Če so bili v tkivu najdeni spermiji, se pripravi partnerico za postopek zunajtelesne oploditve, odmrzne tkivo testisa in izvede metodo ICSI s spermiji iz testisa.

Pred biopsijo testisov sta normalen volumen testisov, to je več kot 12 ml, in normalna vrednost hormona FSH v serumu (manj kot 10 IU/l) dobra pokazatelja prisotnosti spermijev v testisu. Izjema so nekatere oblike zastoja dozorevanja zarodnih celic med spermatogenezo. Vrednost hormona FSH nad 10 IU/l nakazuje, da je spermatogeneza večinoma nenormalna, vendar lahko kljub temu najdemo spermije. Združitev vrednosti FSH z vrednostmi inhibina B, povečuje napovedno moč. V skupini s hormonom FSH več kot 10 IU/l, a z vrednostjo inhibina B nad 65 pg/ml, so spermiji prisotni v isti količini, kot so v skupini s hormonom FSH manj kot 10 IU/l.

Košček tkiva testisa, odvzetega z biopsijo, mora biti za analizo velik vsaj 40 do 50 nedotaknjenih rezin semenskih cevč. Obvezno je takojšnje fiksiranje dela tkiva v operacijski sobi za histološko oceno spermatogeneze. Histološka diagnoza motenj spermatogeneze ni lahka. V primerjavi z živalmi je spermatogeneza pri moških sorazmerno skromna. Zrelih celic ni veliko in spermatogeneza v testisu je lahko heterogena. Med semenskimi cevčkami z malo spermiji so lahko tudi cevčke z normalnim številom spermijev. Včasih so celo pri moških s sindromom Sertolijevih celic mestoma prisotni spermiji; govorimo o fokalni spermatogenezi. Za histološko oceno tkiva po biopsiji testisov se uporablja Johnsenova merila ocenjevanja, ki jasno opredelijo vse oblike zarodnih in Sertolijevih celic (Virant-Klun in sod., 2002).

Histološke ocene vrednotenja spermatogeneze po biopsiji testisov (Johnsen, 1970):

- 10 - zaključena spermatogeneza in popolni tubuli

- 9 - prisotno veliko število spermijev, neorganiziran epitelij, nekoliko poslabšana spermatogeneza
- 8 - prisotnih le nekaj spermijev (manj kot 5 na tubul) in nekaj poznih spermatid
- 7 - ni prisotnih spermijev in poznih spermatid, prisotnih veliko zgodnjih spermatid
- 6 - prisotnih le nekaj zgodnjih spermatid
- 5 - ni prisotnih spermijev niti spermatid, prisotnih veliko spermatocitov
- 4 - prisotnih le nekaj spermatocitov
- 3 - prisotni le spermatogoniji
- 2 - ni prisotnih zarodnih celic, le Sertolijeve celice
- 1 - ni prisotnih ne zarodnih ne Sertolijevih celic

Preostalo tkivo natančno pregleda osebje Laboratorija za oploditev z biomedicinsko pomočjo za prisotnost spermijev, ga zamrzne in shrani v tekočem dušiku za kasnejšo uporabo oziroma postopek zunajtelesne oploditve.

2.6 RAZVOJ ZARODKA V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE

V oplojeni jajčni celici najprej opazimo dve prehodni jedri (pronukleusa). Po oploditvi se zaključi mejoza jajčne celice in na površini jajčne celice se sprosti sekundarno polarno telo. Sledi zlitje obeh pronukleusov, čemur pravimo singamija (Virant-Klun, 2004).

Morfologija in lega pronukleusov je pomembna za kasnejši razvoj zarodka pa tudi število in razporeditev jedrc (nukleolusov) v pronukleusih. Ti dejavniki so povezani z genetskim statusom zarodka, ki se razvija in vplivajo na razvoj zarodka do blastociste ter njegovo ugnezditev. Oplojene jajčne celice, ki imajo okrog pronukleusov področje temnejše citoplazme ("halo efekt"), se razvijejo v zarodke boljše kakovosti (Virant-Klun, 2004). Moški pronukleus (približno 24 μm), lahko nekoliko večji od ženskega (približno 22 μm), nastane približno na mestu, kjer je spermij vstopil v jajčno celico. Ženski pronukleus pa nastane na ooplazmatskem polu mejotskega vretena v bližini izločitve sekundarnega polarnega telesa. Stanje jajčne celice z vidnimi pronukleusi imenujemo pronuklearno stanje, jajčno celico pa prezigota ali ootid. To stanje je opazno približno 15 ur po inseminaciji oziroma postopku ICSI (Virant-Klun in sod., 2002). Že v času tvorbe pronukleusov se tvorijo informacijske ribonukleinske kisline (mRNK), ki jih nastajajoči zarodek potrebuje za hiter razvoj. V moškem pronukleusu so aktivirani določeni geni, predvsem gena na kromosomu Y – *ZFY* in *SRY*, katerih prepise najdemo tudi v dvoceličnem zarodku pred aktivacijo embrionalnega genoma (Virant-Klun, 2004). V pronuklearnem stanju, približno 12 ur po zlitju spermija in ooleme, se v pronukleusih začne sinteza DNK. Napaka v sintezi DNK lahko povzroči, da oplojena jajčna celica v tej fazi zastane in se ne razvija ter deli dalje.

Med nastajanjem pronukleusov se že tvori centrosom zigote, katerega nastanek je ključen za približanje in zlitje pronukleusov oziroma genoma. Okrog centriola spermija se radialno uredijo centrosomski proteini in zvezdasti mikrotubuli. Pronukleusa se tesno zblížata, pri čemer lahko izgineta pronuklearni membrani in se nato zlijeta. Zlitje pronukleusov imenujemo singamija, ki se zgodi približno v centru jajčne celice. Sledi enocelično stanje zigote.

Za jajčne celice po postopku ICSI, ki imajo le en pronukleus, velja, da se niso aktivirale s spermijem, temveč z različnimi dražljaji, predvsem z mehanskim dražljajem ob izvajanju metode. V tem primeru govorimo o partenogenezi. Takšne jajčne celice se lahko dalje razvijajo v zarodek, tudi do blastociste, vendar takšnih zarodkov ne prenesejo v maternico, saj bi morebitna ugnezditev zarodka vodila v neizogibni spontani splav. Končni dogodek v procesu oploditve je reorganizacija in parjenje materinih in očetovih kromosomov, pri čemer nastane zigota. Približno 24-urni proces oploditve se zaključi s sprožitvijo prve celične delitve (mitoze) in razvijati se prične zarodek (Virant-Klun in sod., 2002).

Z napredovanjem celičnih delitev se zarodek polarizira in pojavijo se razlike med celicami. Materine "kratkoživeče" in "dolgoživeče" mRNK, nastale med razvojem in dozorevanjem jajčne celice v foliklu, usmerjajo ter vodijo ves razvoj zigote in nato zarodka do stopnje 4 do 6 celic, ko postane aktiven genom zarodka. Eden najpomembnejših dejavnikov aktivacije zarodkovega genoma je reorganizacija kromatina, ki ga tvorijo DNK in proteini histoni. Med prvima dvema delitvama je zarodek metabolno relativno malo aktiven, na razvojni stopnji 4 do 6 celic pa postane aktiven genom zarodka (do te stopnje se zarodek razvija samo na podlagi materinih nukleinskih kislin) in intenzivnost metabolizma naraste. Vključijo se metabolne poti za sintezo novih, zarodkovih nukleinskih kislin, proteinov in membranskih lipidov. Močno narastejo energetske potrebe zarodka. Neugodne razmere za gojenje na tej stopnji razvoja lahko nepopravljivo poškodujejo zarodek (Virant-Klun, 2004).

Razvoj zarodka se prične z združitvijo jajčne celice in spermija, migracijo ter združitvijo pronukleusov gamet in z obsežnim demetiliranjem genoma, preko oznak vtisnjenih lokusov ter reprogramiranjem iz razvoja gamet v razvoj zarodka. Cilj predimplantacijskega obdobja razvoja je premik iz razvoja, vodenega z jajčno celico/spermijem, v razvoj, voden s strani zarodka. Med to tranzicijo morajo biti uničene informacije, ki so služile za diferenciacijo in vzdrževanje spolnih celic, medtem ko mora priti do začetka izražanja informacij za rast in diferenciacijo celic zarodka. Med razvojem zarodka pride do popolnega demetiliranja DNK, ki se še pred implantacijo ponovno vzpostavi. Med tem časom postanejo vzpostavljeni unikatni vzorci metiliranja humanega genoma in izražanje genov, ki so temeljni za regulacijo razvoja. Reprogramiranje iz materinega in parentalnega pronukleusa je esencialen del zgodnjega razvoja človeškega zarodka, ki se prične s transkripcijskim mirovanjem (Pera, 2011).

Razvoj zarodka je izjemen iz različnih razlogov, med drugim tudi tega, da približno vse do tretjega dne jajčna celica zagotavlja vse vire za opravljanje kompleksnih razvojnih poti, v odsotnosti transkripcije. Nadaljnje reprogramiranje, ki se pojavi v transkripcijskem mirovanju, vključuje enega bolj zahtevnih setov kromosomov – kromosome, prevzete od spermijev, ki so visoko kondenzirani in metilirani ter organizirani okrog protaminov (Pera, 2011). Pera in sod. (2011) so v raziskavi spremljali razvoj 242 humanih zarodkov od zigote (dan 1, ena celica) do blastociste in naredili povezavo med temi razvojnimi stopnjami, morfologijo ter molekularnimi karekteristikami zarodka. Zgradili so model razvoja humanega zarodka. Ugotovili so, da trije parametri kolektivno napovedujejo oblikovanje blastociste, in sicer: trajanje prve citokineze, čas med koncem prve delitve in začetkom druge delitve ter sinhronost blastomer pri drugi delitvi iz dveh celic v štiricelični zarodek. Vsi zarodki, ki so se razvili do razvojne stopnje blastociste, so kazali podobne vrednosti pri vseh treh parametrih, medtem ko so se vrednosti v razvoju razvojno zaustavljenih zarodkov zelo razlikovale. To nam pove, da imajo zarodki z natančnimi časovnimi okviri v citokinezi in mitozii med prvima dvema delitvama veliko večjo možnost uspešnega razvoja v blastocisto (Slika 10).

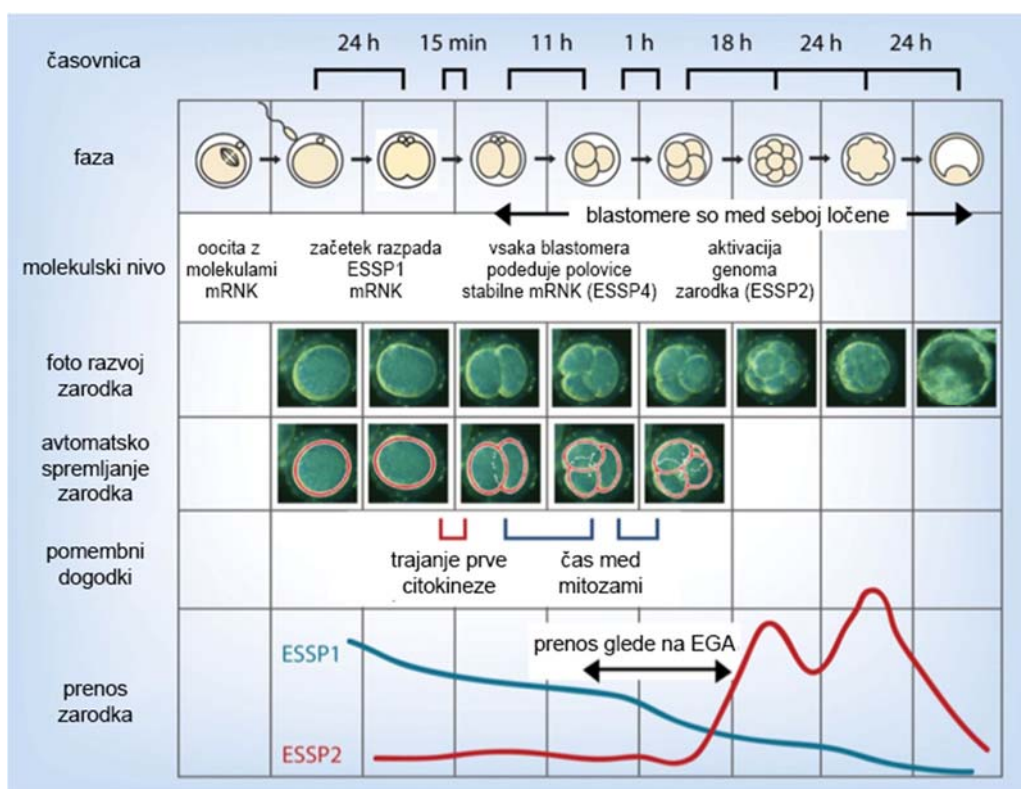
Na 2. dan gojenja ima zarodek povprečno 2 do 4 celice. Prva delitev zigote, dvocelični zarodek, se pojavi približno 30 ur po inseminaciji jajčne celice (v postopku ICSI nekoliko prej). Druga celična delitev, štiricelični zarodek se pojavi približno 40 do 50 ur po inseminaciji. Nekateri zarodki nekoliko pohitijo in imajo lahko v tem obdobju tudi 5 ali 6 celic. Moški zarodki se razvijajo nekoliko hitreje kot ženski. Vse celice zarodka so med seboj enake in še niso diferencirane. Razvijajoči se zarodek je dobre kakovosti, če ima čim več celic, ki so enako velike in lepo okrogle. Meje med njimi morajo biti dobro vidne. Zarodek dobre kakovosti ima manj kot 10 volumskih odstotkov citoplazemskih fragmentov, ki so anuklearni. Pomembna je tudi struktura, fina zrnatost in homogenost citoplazme ter normalna debelina in nepoškodovanost cone pelucide. Najpomembnejši kazalec kakovosti zarodka je fragmentacija, ki naj bi predstavljala način za odstranjevanje nenormalnih celic. Fragmenti so lahko razpršeni ali pa se pojavljajo v zarodku lokalno. Bolj fragmentirani zarodki se običajno slabše razvijajo do blastociste in imajo manj možnosti za ugnezditev v maternici.

Na 3. dan gojenja ima zarodek, ki se normalno razvija povprečno 8 do 10 celic. Celice so še vedno vse enake, nediferencirane, pluripotentne (lahko se razvijejo v katerikoli drug tip celice). Prenos zarodkov na 3. dan predstavlja prednost pred prenosom na 2. dan, saj tako izločimo zarodke, ki se razvojno zaustavijo po prvih dveh delitvah.

Na 4. dan gojenja, približno 96 ur po inseminaciji ima zarodek dobre biološke kakovosti približno 32 celic in doseže stopnjo kompaktnega zarodka, morule. Celice postanejo ob medsebojnih mejah bolj ploščate in med seboj zelo tesno povezane. Kompaktnost je odvisna od ravni kalcija v celicah in se pojavi samo po prepisu zarodkovega genoma.

Močno naraste sinteza zarodkovih RNK in proteinov. Spremeni se način sinteze fosfolipidov. Ob koncu razvoja morule nastanejo nove morfološke spremembe. Razvoj se usmeri v nastajanje blastociste. Zunanje celice se začno razvijati v trofoblast, ki predstavlja prve diferencirane celice v zarodku. Začetna vloga trofoblasta v moruli je črpanje vode in ionov v morulo, kar omogoča nadaljnji razvoj blastociste. Nastajati začne votlinica, imenovana blastocel, odvisno od aktivnega, energetsko pogojenega transporta ionov (delovanje encima Na/K ATP-aza), še posebno klorovih ionov.

Pri nekaterih zarodkih kljub delitvam in naraščanju števila celic ne pride do kompaktnosti ali pa se ta pojavi in izgine, ne da bi se zarodek razvil v blastocisto. Takšen zarodek propade in nima možnosti za ugnezditev. Pomembno je poznati kakovost blastociste, ki vključuje: stopnjo razvitosti, izluščenje (da se zarodek lahko ugnezdi v maternico mora zlesti iz zone pellucide), razvitost in morfologijo embrioblasta ter trofoblasta. Blastocista je zadnja razvojna stopnja zarodka, ki lahko živi *in vitro*, kasneje je razvoj že preveč kompleksen in gojišča *in vitro* ne zadoščajo več (Virant-Klun, 2004).



Slika 10: Model razvoja zarodka, postavljen na podlagi korelacije spremljanega razvoja in molekulskih analiz (Pera, 2011).

Za določitev molekularnih mehanizmov, povezanih z morfološkimi dogodki, so Pera in sod. (2011) sočasno spremljali gensko izražanje vsakega spremljanega zarodka. Glede na

fazo, kjer so se izražali določeni geni, so oblikovali štiri za fazo specifične vzorce izražanja (angl. *Embryonic stage specific patters* – ESSPs) (Slika 11): ESSP1 je predstavljala maternalno (od jajčne celice) dedovano mRNK z usodo degradacije in visokim nivojem izražanja na stopnji zigote ter posledično polovično zmanjšano ekspresijo v naslednjih 21 urah; ESSP2 so predstavljali *EGA* geni (angl. *Embryonic gene activation*); ESSP3 so predstavljali kasneje aktivirani geni na razvojni stopnji morule do blastociste; ESSP4 so bili stabilni prepisi. V nekaterih blastomerah nekateri materinski prepisi niso bili degradirani, kar kaže na dve lastnosti razvoja humanega zarodka: degradacija materinskih prepisov ni spontan proces, pač pa mora biti materinska degradacija RNK v blastomerah aktiven proces, ki vključuje specifične RNK-degradacijske mehanizme, ki ciljajo na specifične podskupine RNK, te pa se ohranijo le približno 21 ur. Nadalje, najdenih ni bilo nobenih zarodkov oziroma blastomer, ki bi sočasno izražali visok nivo materinskih prepisov in zarodkovih prepisov, kar pomeni, da je za aktivacijo embrionalnega genoma predpogoj natančno in obsežno uničenje materinskih prepisov. Izražanje genov pri zarodkih, ki so se zaustavili v razvoju, so je razlikovalo od normalno razvijajočih zarodkov in tudi med seboj glede na morfološki fenotip. Razlike v nivoju genskega izražanja pri normalnih in razvojno zaustavljenih zarodkih so vključevale komponente citokineze, gene, vključene v miRNK biogenezo, in mRNK shranjevanje ter procesiranje. Specifični geni z znižano stopnjo ekspresije pri nenormalnih zarodkih so bili *DGCR8*, *Dicer*, *TARBP2*, *CPEB1* in *Symplekin* (Pera, 2011).

Aktivacija genoma je eden izmed prvih kritičnih dogodkov v življenju novega organizma in je bistvenega pomena, saj nepravilna časovna regulacija dogodkov in aktivacija izražanja določenih genov lahko vodita v zastoj razvoja zarodka. Tako čas aktivacije genoma kot nabor aktiviranih genov morata biti pravilno nadzorovana. Aktivacija genoma se pojavi postopoma, pri tem je potreben uspešen prepis nekaterih genov za sledečo aktivacijo genoma. Razpoložljivost genoma za transkripcijo in zagotavljanje specifičnosti transkripcije omogočajo zlasti spremembe v histonski sestavi kromatina in struktura kromatina. Tako med zgodnjimi kot kasnejšimi stopnjami aktivacije transkripcije ob aktivaciji genoma so nujne spremembe v delovanju transkripcijskih faktorjev in sintezi proteinov. Oba pogoja, spremembe v strukturi kromatina in dostopnost transkripcijskih faktorjev, sta regulirana s celičnimi, od ciklusa odvisnimi mehanizmi, ki omogočajo potrebno usklajenost med procesi, kot so podvojevanje DNK in delitev celice (Latham in Schultz, 2001).

Gre za proces, s katerim zarodek začne prepisovati svoj novo oblikovani genom. Aktivacija genoma je bistvena za sintezo novih proteinov in nadaljno delitev zarodka. Le majhno število zarodkovih genov je aktivnih pred fazo štirih celic. Ti geni kodirajo proteine, ki sodelujejo pri stabilizaciji in kontrolirajo aktivnost materine mRNK ter proteinov. Embrionalni proteini povečujejo stabilnost in translacijsko sposobnost mRNK s poliadenilacijo UTR 3' konca mRNK (neprevajajoča se regija). Sprostitev kalcijevih ionov

pri oploditvi je povezana s translacijo materinske mRNK; inhibicija sprostitve Ca^{2+} ionov preprečuje prevajanje mRNK. Domneva se, da so materinske mRNK zaplenjene s prevajalskimi inhibitornimi kompleksi in da sproščanje Ca^{2+} povzroči fosforilacijo teh kompleksov, ki spustijo mRNK in omogočijo poliadenilacijo ter začetek translacije. Deadenilacija materinske mRNK 3' UTR s proteini zarodka destabilizira mRNK in ta postane tarča za uničenje. Modifikacija in uničenje specifičnih materinskih mRNK in proteinov je pomembno za regulacijo razvoja zarodka pred glavno aktivacijo njegovega genoma. Da se aktivacija genoma lahko prične, mora zarodek izstopiti iz okolja, ki zatira transkripcijo in sintetizirati svojo transkripcijsko in translacijsko "mašinerijo". Omejena velikost spermija pomeni, da mora biti paternalna DNK hiperkondenzirana, da se lahko nahaja v jedru. To omogočajo majhni proteini, protamini, ki so povezani s parentalno DNK v nukleoproteinski kompleks. Hiperkondenzacija očetovskih kromosomov zarodka pomeni popolno nedostopnost za transkripcijo. Materinski proteini torej nadomestijo pakiranje protaminov s histoni (proteini, normalno povezani z nukleinskimi kislinami, ki omogočajo oblikovanje in organizacijo kromatina). Histoni H3 in H4 zamenjajo protamine in s tem kromosomi postanejo transkripcijsko dostopni (Studart, 2016).

DNK spermijev pacientov s skrajno OAT lahko vsebuje nepravilnosti, kot so rahlo pakiranje kromatina in verižne zlome (fragmentacijo) DNK. Pri uporabi ICSI so ti morfološko nenormalni spermiji sicer sposobni oploditi jajčno celico, vendar se nepravilnosti v DNK vseeno lahko pokažejo kot zastoj v razvoju zarodka pred ugnezditevno fazo (Miller in Smith, 2001). Še več naj bi bilo vprašanj o postopku ICSI s spermiji iz epididimisa ali testisa, saj naj bi bile pri moških z neobstruktivno azoospermijo kromosomske nepravilnosti bolj pogoste. Pri spermijih iz testisa naj bi bilo genetsko vtisnjenje (angl. *imprinting*) ob času oploditve še nedokončano (Knez, 2009). Genetsko vtisnjenje, ki opisuje alelna-specifično izražanje nekaterih genov in pri katerem se izrazi le ena od starševskih kopij gena, igra pomembno vlogo pri regulaciji razvoja zarodka, ugnezditvi in pri nevrovedenjskih procesih. Nenormalno izražanje večih vtisnjenih genov je povezano s številnimi boleznimi, razvojnimi nepravilnostmi in malignimi tumorji pri človeku (Sato in sod., 2006).

Raziskave (Shoukir in sod., 1998) so pokazale, da ima pri oploditvi z metodo ICSI jajčna celica z injiciranim spermijem iz ejakulata z visoko progresivno gibljivostjo veliko večjo možnost, da doseže razvojno stopnjo blastociste. Prav tako sta povezavo med progresivno gibljivostjo in zgodnjim razvojem zarodka do šestega dne ugotovila tudi Miller in Smith (2001). Dobra progresivna gibljivost je lahko pokazatelj ustrezne presnovne aktivnosti, viabilnosti spermijev in njihove primernosti za uporabo pri zunajtelesni oploditvi. To lahko razloži, zakaj so zarodki po oploditvi z živimi, a negibljivimi spermiji z metodo ICSI slabše kakovosti in imajo slab razvojni potencial. Spermiji pri pacientih z astenoospermijo imajo prav tako večjo pojavnost jedrnih nepravilnosti, ki vodijo v počasno ali delno dekondenzacijo kromatina, kar lahko nadalje vodi v zgodnjo ustavitev

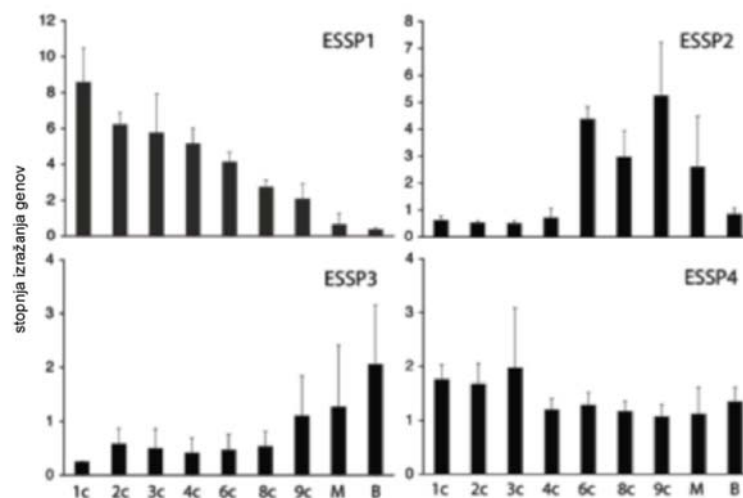
razvoja zarodka. Pri spermijih s slabo progresivno gibljivostjo se tudi pogosteje pojavijo okvare aksoneme in centriola. Okvarjen centriol, ki ga pri oploditvi podeduje zarodek pa lahko vodi v kromosomske in jedrne aberacije in nenormalen razvoj (Miller in Smith, 2001). V raziskavi Miller in Smith (2001), kjer so ugotavljali vpliv ICSI in parametrov kakovosti semena na razvoj zarodka do razvojne stopnje blastociste so opazili, da so koncentracija, progresivna gibljivost in morfolologija spermijev pomembno povezani z razvojem do blastociste.

Prav tako je potrebno upoštevati, da je metoda ICSI že sama po sebi invazivna in lahko ogroža razvoj zarodka ter vodi v fizikalne motnje jedrnih ali citoplazmatskih komponent znotraj jajčne celice, ki so pomembne za razvoj zarodka.

Izvor spermijev (ejakulat, epididimis, testis) oziroma resnost motnje v spermatogenezi lahko vpliva na razvoj zarodka do razvojne stopnje blastociste in njeno implantacijo. Pri pacientih z neobstruktivno azoospermijo se po postopku ICSI zarodki slabše in počasneje razvijajo do razvojne stopnje blastociste, ki ima manjšo zmožnost ugnezditve (Balaban in sod., 2001). Očetov vpliv na razvoj zarodka se najbolj kaže po aktivaciji genoma zarodka, to je po pojavu prvih parentalnih transkripcijskih produktov. Balaban in sod. (2001) so v raziskavi tudi ugotovili, da je stopnja oploditve in oploditev z dvema pronukleusoma po ICSI opazno zmanjšana pri skupini pacientov z neobstruktivno azoospermijo v primerjavi z oploditvijo s spermiji iz ejakulata in v primerjavi s skupino z obstruktivno azoospermijo. Deleči se zarodki iz skupine z neobstruktivno azoospermijo redkeje dosežejo razvojno stopnjo blastociste, prav tako se je pokazalo, da je odstotek izluščenja in razvijanja blastociste pri tej skupini značilno manjši. Ti rezultati kažejo očetovski vpliv na razvoj zarodka in vpliv izvora spermijev na kakovost razvijajočega se zarodka v zgodnjih stopnjah razvoja. Večja resnost vzroka neplodnosti, kot je na primer obstruktivna ali neobstruktivna azoospermija, je lahko povezana tudi z znižanjem oploditve jajčnih celic po ICSI.

Razvoj zarodka je povezan z njegovim genetskim statusom in je lahko moten zaradi sprememb metabolizma ter porušenega ionskega ravnotežja, kar povzroči spremembo znotrajceličnega pH in ravni kalcija. Encimi, ki sodelujejo pri tvorbi kemične energije, potrebne za življenje zarodka, so zelo občutljivi na spremembe pH in nihanja v koncentraciji kalcija, kar lahko povzroči dodatne funkcijske in strukturne poškodbe na različnih ravneh zarodka (Virant-Klun, 2004).

Na razvojni stopnji blastociste postane glavni energetski substrat zarodka glukoza, ki je nujna za razvoj in izluščenje blastociste. Aktivacija natrijeve-kalijeve črpalke, ki je odvisna od encima ATP-aze, olajša tvorbo s tekočino napolnjene votline, blastocela. Ta proces namreč zahteva natančno ravnotežje ionov, in tudi dovolj energije iz aktivnega metabolizma (Virant-Klun, 2004).



Slika 11: Nivo ekspresije posameznih specifičnih vzorcev izražanja genov glede na fazo razvoja humanega zarodka (Pera, 2011)

2.7 TIME-LAPSE MIKROSKOPIJA IN SPREMLJANJE DINAMIKE RAZVOJA ZARODKA

Razvoj zarodka v predimplantacijski dobi je kompleksen proces, ki vključuje vrsto morfoloških in molekularnih dogodkov. Pravilen razvoj zarodka vključuje natančno odvijanje dogodkov. Točnost časovnih okvirov in zaporedja dogodkov v razvoju zarodka je bistvenega pomena. Mikroskopija v časovnih presledkih (angl. *Time-lapse microscopy*, TLM) je idealno orodje za študij dinamike bioloških procesov zgodnjega razvoja zarodkov, saj zagotavlja morfološke, dinamične in kvantitativne časovne podatke, pridobljene na neinvaziven način. TLM ima številne prednosti pred klasično mikroskopijo v določenih časovnih točkah (angl. *time-point microscopy*). Pri uporabi TLM so biološki vzorci gojeni neposredno pod sistemom za fotografiranje, ki zajema slike pri določenih intervalih v določenem časovnem obdobju. Posamične posnete slike lahko nato procesiramo v časovna zaporedja in iz video sekvenc pridobimo morfološke, dinamične in kvantitativne podatke o razvoju zarodka. V nasprotju s tem pa pri klasični mikroskopiji v določenih časovnih točkah pridobimo slike, ki so pogosto izbrane subjektivno s strani uporabnika, ne glede na biološko ustreznost, in so pridobljene v znatno nižji časovni frekvenci kot pri TLM. Kot primer: pri ocenjevanju zarodkov in embrioloških raziskavah lahko slike zbiramo dnevno, medtem ko TLM omogoča, da slike razvijajočega se zarodka ujamemo v 20 minutni, 5 minuti ali celo 10 sekundni frekvenci (Wong in sod., 2013).

Dober primer, kjer podatki, pridobljeni s TLM, podprejo raziskave zgodnjega razvoja zarodka, so pokazali Wong in sod. (2010). Pri spremljanju razvoja dveh morfološko

podobnih si zarodkov na isti stopnji razvoja, kot je bilo ugotovljeno s klasično mikroskopijo v časovnih točkah, so z uporabo TLM ugotovili, da gre dejansko za dva popolnoma različna procesa v njunem razvoju. En zarodek je bil osemcelični in je sledil normalnemu razvoju, medtem ko je bil drugi zarodek rezultat niza nenormalnih delitev celic in fragmentiranosti, kar so pokazali podatki TLM. S TLM dobimo podatke o dinamiki razvoja, kot so formacija in zlitje pronukleusov, točen čas med dvema celičnima delitvama in čas trajanja citokineze (Wong in sod., 2010).

Podatki TLM torej podajo bolj popolno sliko o biološkem procesu in omogočajo natančnejšo znanstveno ter klinično morfološko interpretacijo. Prednost TLM je tudi v sposobnosti ohranitve vzorcev kulture v optimalnem okolju gojenja, skozi celoten čas pridobivanja podatkov, saj je možno postaviti sistem v CO₂-inkubator za gojenje zarodkov. TLM spremlja tudi edinstvena možnost združitve zajetih slik s programsko opremo za analizo slik. Programska oprema za zajemanje slik omogoča optično poravnavo, fokusiranje, zajem in shranjevanje slike. Nadalje omogoča programska oprema prek sistema za analizo "computer vision" tudi kvantitativno oceno zarodka ter spremljanje razvoja v realnem času na podlagi narejenih posnetkov (Wong in sod., 2013).

Raziskave s TLM so pokazale, da kontinuirano opazovanje morfologije zgodnjih zarodkov in natančnega časa ključnih dogodkov v njihovem razvoju poda natančne podatke, iz katerih lahko napovemo potek nadaljnjega razvoja zarodka, uspešnost implantacije in nosečnosti. Vsako prezgodnjo/prepozno delitev celic lahko povežemo s časovno odvisno nepravilnostjo v razvoju zarodka (Knez in sod., 2013). TLM postaja vse bolj cenjena, tako v osnovnih embrioloških študijah kot pri oploditvah z biomedicinsko pomočjo. Ker TLM ne povzroča nikakršnih negativnih učinkov na razvoj zarodka, se lahko varno uporablja kot orodje za izbiro najkakovostnejšega zarodka za prenos v maternico (Wong in sod., 2013). Trenutno potekajo intenzivne raziskave algoritma razvoja zgodnjih zarodkov glede na njihovo kakovost in implantacijo, ki bi bil klinično uporaben v programu zunajtelesne oploditve. Še vedno je edini parameter za ocenjevanje kakovosti zarodkov v programu zunajtelesne oploditve njihova morfologija, kar pa je lahko subjektivno in nezanesljivo. Poleg tega se morfologija zarodkov med razvojem lahko spreminja in ni zanesljiv pokazatelj kakovosti zarodka.

Eno izmed pomembnih vprašanj je, kako izvor in zrelost spermija vpliva na dinamiko razvoja zarodka. V raziskavi Lammers in sod. (2015) niso ugotovili razlik v razvoju zarodkov do blastociste med skupinama OAT in TESE, torej po oploditvi s spermiji slabe kakovosti iz ejakulata in spermiji iz testisa. Pokazalo pa se je, da se pozni celični dogodki odvijajo veliko kasneje pri skupini zarodkov, po oploditvi s spermiji, ki so bili pridobljeni kirurško iz testisov, kot po oploditvi s spermiji iz ejakulata. Le čas pri razvoju iz 2-celičnega v 3-celični stadij in razvoj do 8-celičnika je bil pri skupini OAT opazno daljši. Tudi kar zadeva razvoj morule in blastociste so se vsi celični dogodki zgodili kasneje pri

zarodkih iz skupine TESE. Ker niso odkrili relevantnih razlik med zgodnjim razvojem zarodkov iz primerjanih skupin, menijo, da bi bile potrebne nadaljnje raziskave, ki bi se osredotočile tudi na kasnejše stopnje v razvoju zarodka.

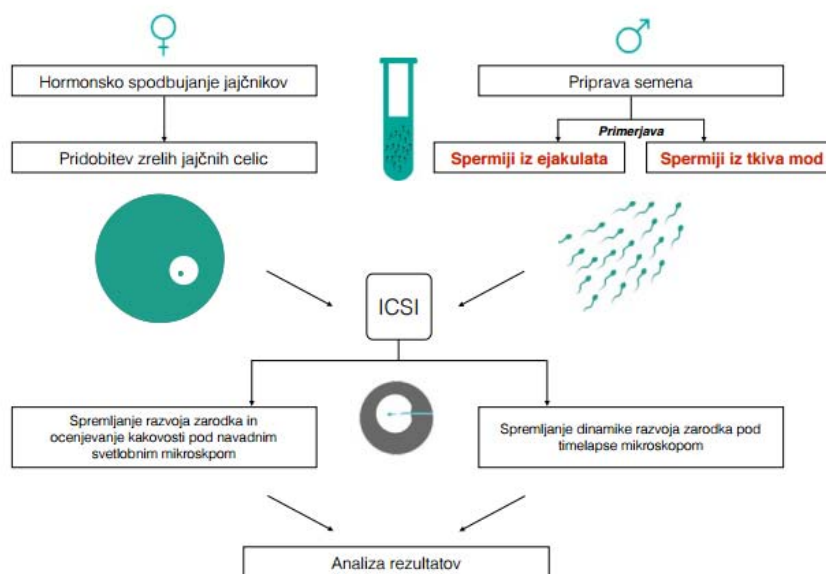
V raziskavi Hickmana in sod. (2013) so primerjali razvoj med 192 zarodki po oploditvi s spermiji, zamrznjenimi in pridobljenimi s kirurškim posegom, ter 156 zarodki, dobljenimi iz spermijev iz svežega ejakulata. Ugotovili so, da so zarodki iz skupine TESE veliko prej dosegli 2 –celični stadij, medtem ko se je v primerjavi s skupino OAT morula izoblikovala veliko kasneje, prav tako je bilo kasnejše tudi izluščenje blastociste. Avtorji predvidevajo, da na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da izvor spermijev prispeva k morfokinetičnim lastnostim zarodka, predvsem pa vpliva na prvo delitev in razvoj zarodka po njegovi aktivaciji genoma (Hickman in sod., 2013).

Da bi odgovorili na to pomembno vprašanje, so potrebne nadaljnje raziskave.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

Da bi lahko spremljali dinamiko razvoja zarodkov s time-lapse mikroskopijo, smo morali najprej izvesti postopek zunajtelesne oploditve pri neplodnih parih z OAT (spermiji iz ejakulata) ali azoospermijo (TESE; spermiji iz testisa) z metodo ICSI kot del redne klinične prakse (Slika 12).



Slika 12: Prikaz poteka dela

3.2 PRIDOBITEV JAJČNIH CELIC

Postopek zunajtelesne oploditve se prične s hormonskim spodbujanjem jajčnikov za pridobitev jajčnih celic pri ženskah. Namen tega je zavreti naravno delovanje jajčnikov in umetno regulirati njihovo delovanje, da bi dobili več jajčnih celic.

V prvi fazi postopka smo pri pacientkah izzvali rast večjega števila jajčnih celic v jajčniku. Naravno v jajčniku dozori samo en folikel in v njem ena jajčna celica, ki se sprosti v času ovulacije in je pripravljena za oploditev. Spodbujanje jajčnikov je potekalo s prejetjem hormonskih injekcij. Dnevno od 22. dne cikla je pri pacientkah potekalo prejetje zdravila Suprefact® v obliki podkožnih injekcij. Rast in zorenje foliklov je bilo spremljano z ultrazvokom jajčnikov in z določanjem ravni hormonov v krvi. Po petnajstih dneh je sledila ultrazvočna preiskava maternice in jajčnikov. Če so izvidi raziskav ustrezali kriterijem, se je nadaljevalo z uporabo Suprefakta do prejema "stop injekcije" humanega

horionskega gonadotropina HCG. Hkrati s Suprefaktom se je od petnajstega dne uporabe zdravila pričelo spodbujanje jajčnikov z injekcijami hormonov gonadotropinov – Menopur[®] ali Puregon[®]. Deseti dan spodbujanja s hormoni gonadotropini je bila opravljena ultrazvočna kontrola. Merila za skorajšnjo dozorevanje jajčnih celic so izpolnjena, ko je premer foliklov v jajčniku vsaj 15 mm in je prisotna zadostna količina estradiola v krvi, ki je merilo za zrelost foliklov. Ko so kriteriji rasti foliklov doseženi, pacientka prejme injekcijo, ki izzove dokončno dozorevanje jajčnih celic (Pregnyl[®], Primogonyl[®], Ovitrelle[®]). Pridobivanje jajčnih celic je lahko potekalo tudi po kratkem protokolu, kjer od drugega dne poteka spodbujanje jajčnikov s prejetjem injekcije hormonov gonadotropinov (Menopur[®] ali Puregon[®]) v odmerkih, ki ostanejo enaki ves čas stimulacije. Sedmi dan spodbujanja oziroma osmi dan menstrualnega ciklusa se opravi ultrazvočni pregled rodil in se odloči o nadaljnjem zdravljenju ter morebitnem dodajanju antagonista gonadotropin sproščajočega hormona GnRH. Ko so doseženi utrazvočni kriteriji rasti foliklov, pacientka prejme injekcijo, ki izzove dokončno dozorevanje jajčnih celic (Pregnyl[®], Primogonyl[®], Ovitrelle[®]).

Dokazano je, da traja zadnja stopnja zorenja približno 32 do 36 ur. Glede na to znanje je potrebno jajčno celico v tem času izsrkati iz jajčnika. Ta postopek se imenuje ultrazvočna aspiracija (punkcija) jajčnih celic in poteka v lokalni anesteziji (Virant-Klun in sod., 2002). Drugi dan po "stop injekciji" je bila pri pacientkah opravljena punkcija jajčnikov, s katero smo pridobili jajčne celice. Aspiracija poteka z aspiracijsko iglo, s katero gremo skozi steno nožnice do jajčnika in iz vsakega folikla počrpamo folikularno tekočino z jajčno celico. Več kot je jajčnih celic, večja je verjetnost, da bo postopek zunajtelesne oploditve uspel. Ponavadi gre za pridobitev petih do osmih jajčnih celic.

Zrelost jajčne celice je bila ocenjena po videzu kompleksa jajčna celica – kumulus.

Po vsaki punkciji smo v folikularni tekočini pod stereomikroskopom (povečava 90 do 750-kratna) poiskali jajčne celice. Delo je potekalo v sterilnih pogojih, pri 37 °C, v brezprašni komori. Jajčne celice so bile dobro sprane v gojišču in očiščene. Potrebno je bilo odstraniti maso foliklovih celic, kumulus. Jajčne celice so bile gojene v ustreznem gojišču, v inkubatorju na 37 °C, 6 % CO₂ (za vzdrževanje ustreznega pH gojišča) in v temi. Gojišče za jajčne celice vsebuje različne organske in anorganske substance.

Sestava gojišča za jajčne celice UNIVERSAL IVF MEDIUM (Medi-Cult):

- Earls Balanced Salt Solution – EBSS (kalcijev klorid, kalijev klorid, magnezijev sulfat, natrijev klorid, natrijev hidrogenkarbonat, natrijev hidrogenfosfat, D-glukoza, fenolrdeče),
- natrijev piruvat,
- sintetični nadomestki seruma,
- natrijev bikarbonat,

- humani serumski albumin,
- penicilin,
- streptomycin,
- fenolredče.

3.3 PRIDOBITEV SPERMIJEV

Seme, ki ga pacient odda v posodici, pustimo stati pol ure na sobni temperaturi, da se utekočini. Za pripravo semena smo uporabili posebno gojišče Sperm Prep[®] (Sperm Preparation Medium; Medi-Cult).

V 14 ml epruveti smo pripravili gradient gojišč z različno koncentracijo. Spodaj 2 ml 100 % Pure Sperm[®] (NidaCon, Scandinavian IVF Sciences), v sredini 2 ml 40 % Pure Sperm[®] + Sperm Prep[®] medij in nato 2 ml semena. Sledilo je 30 min gradientno centrifugiranje pri 1200 obratih / min. Oddelili smo vrhnja dva sloja, spodnjega z živimi in gibljivimi spermiji pa prenesli v centrifugirko, kamor smo prej nalili 4 ml Sperm Prep[®] gojišča. Dobro smo premešali in centrifugirali 10 min pri 1400 obratih/min. Pri tem koraku smo želeli sprati gojišče Pure Sperm[®]. Oddelili smo večji del gojišča, da je ostal približno 1 ml ter previdno dodali 0,3–0,7 ml čistega gojišča. Pri tem smo pazili, da nastane gradient. Epruveto smo za pol ure postavili v inkubator. Pri tem vitalni spermiji splavajo na površje (*angl. swim up*). Vrhno plast z najboljšimi spermiji smo previdno pobrali z iglo in brizgo. Seme je po pripravi prečiščeno. Eno kapljico semena smo pogledali pod mikroskopom in ocenili koncentracijo in gibljivost spermijev in ustrezno število spermijev uporabili za oploditev.

Barvanje razmaza semena po Papanicolaou (World Health Organization, 2010).

Morfologija spermijev se oceni v Androloškem laboratoriju. Mokre preparate se najmanj 30 minut fiksira v 96 % etanolu, nato se jih potopi najprej za 2 minuti v barvilo hematoksilin. Sledi spiranje z vodo in 70 % etanolom ter enominutno barvanje z barvilom Orange G – OG 6. Nato preparate dvakrat speremo s koncentriranim etanolom in tri minute barvamo z barvilom Polychrome solution EA 31 ter na koncu dvakrat speremo s koncentriranim in dvakrat z absolutnim etanolom. Preparat pustimo stati 30 minut v ksilolu in ga nato pokrijemo s kanada balzomom ter krovnim stekelcem. Dobimo trajni preparat, ki se ga lahko uporabi tudi za kasnejše preiskave. Uporabljeni barvila prikazuje Preglednica 3.

Preglednica 3: Barvila za barvanje po Papanicolaou

BARVILO	NAMEMBNOST
Harris hematoxylin solution (Merck®)	Hematoksilini se povežejo s trivalentnimi pozitivno nabitimi kovinskimi ioni, ki se vežejo na DNK. Barvilo obarva jedra modro, vijolično do črno.
Orange G solution (Merck®)	Barvilo daje bledorumeno do oranžno barvo citoplazme. Obarva keratin.
Polychrome solution EA 31 (Merck®)	Rjavo obarva repe spermijev in citoplazmatske komponente.

Spermiji za oploditev jajčnih celic:

Pri pripravi semena smo izbrali najbolj kakovostne spermije. Za postopek klasičnega IVF približno 2,5 ure po punkciji nakapljammo seme v kvader z jajčnimi celicami. Glede na koncentracijo spermijev, ki se določa v Neubauerjevi komori, se odločimo za število kapljic suspenzije spermijev, ki jih dodamo jajčni celici (inseminacija). Pri ICSI pa smo v pokrovček male petrijevke (TC dish, Nunc®) dodali kapljice s primerno koncentracijo spermijev in prelili s parafinskim oljem ter postavili v CO₂-inkubator.

Pri moških z azospermijo smo dobili spermije z aspiracijo ali biopsijo testisa, pri čemer je bila potrebna kirurška pridobitev koščka tkiva testisa z volumnom približno 4-5 mm³ (Slika 13).



Slika 13: Košček tkiva testisa za pripravo spermijev iz testisa za postopek ICSI (Viran-Klun in sod., 2002)

Košček pridobljenega tkiva položimo na sterilni objektnik. Tkivo z iglo razdelimo na majhne koščke, kar omogoča sprostitvev spermijev iz semenskih cevok. Z razmazom preprata je ugotovljena prisotnost spermijev, ki bi lahko bili uporabljeni za postopek ICSI. Postopek zunajtelesne oploditve lahko izvedemo s svežimi ali zamrznjenimi ter odmrznjenimi spermiji. Nato tkivo pripravimo na enak način kot seme s centrifugiranjem na gradientu PureSperm-a V primeru da gre za diagnostično biopsijo ali za tekoč postopek

zunajtelesne oploditve in je bilo za postopek pridobljenega precej tkiva, je bilo tkivo programsko zamrznjeno v raztopini krioprotektanta (10 % glicerol) do $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ in hranjeno v tekočem dušiku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Klinični rezultati, ki jih dosežemo z odmrznjenimi ali svežimi spermiji iz testisa so enaki (Virant-Klun in sod., 2002). Sveže ali odmrznjeno tkivo testisa je bilo pripravljeno na koncentracijskem gradientu Pure Sperm[®], na enak način kot seme slabe kakovosti. Po pripravi smo spermije prenesli v mikrokapljice gojišča pod parafinskim oljem in izvedli metodo ICSI.

3.4 PRIPRAVA GOJITVENIH POSODIC IN GOJIŠČ ZA ZARODKE

Preglednica 4: Uporabljeni materiali in mediji za postopek ICSI

Materiali in mediji za postopek ICSI	NAMEMBNOST	SESTAVA
Fertilization medium COOK [®] medical	Gojišče za jajčne celice	Bikarbonatna puferna raztopina. Zagotavlja z glukozo bogato okolje za učinkovit metabolizem kompleksa jajčne celice in kumulusa ter spermijev. Vsebuje antioksidante in neesencialne amino kisline, ki pomagajo zagotoviti primerno okolje za fuzijo gamet.
Pure Sperm 100 [®] Nicadon	Sterilna suspenzija koloidnih silikonskih delcev v izotonični raztopini soli, optimizirana za pripravo gostotnega gradienta za ločevanje in čiščenje humanega semena za uporabo za OBMP. Učinkovito ločevanje spermijev od limfocitov, epitelnih celic, bakterij, semenske tekočine, ...	Silikonski delci, obdani s silanom, kalcijevimi ioni, kloridnimi, kalijevimi, natrijevimi ioni, voda, HEPES, EDTA, glukoza.
Sperm Prep 40 [®] COOK	Osnovno gojišče za spermije	
SAGE 1-step medium ORIGIO	Gojenje TL zarodkov	Magnezijev sulfat, fosforjev klorid, fosforjev fosfat, natrijev klorid, amino kisline, L-alanil-L-glutamin, kalcijev-L-laktat, glukoza, natrijev piruvat, natrijev bikarbonat, EDTA, gentamicin, fenol rdeče.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Uporabljeni materiali in mediji za postopek ICSI

Materiali in mediji za postopek ICSI	NAMEMBNOST	SESTAVA
Parafinsko olje ORIGIO	Oljna obloga za gojitveni medij. Pomaga stabilizirati pH in znižati izhlapevanje vode iz mikrokapljič gojišča med postopkom.	Lahko mineralno olje
IVF 4 weil plate NUNC® (slika 14)	Za gojenje izven TL sistema	
Wow dish posodice VITRO LIFE (Slika 15)	Za gojenje pod sistemom PrimoVision TLM.	Mikro gojitvena posodica z odprtino na pokrovu



Slika 14: Gojitvena posodica IVF 4 weil plate NUNC za gojenje zarodkov izven time-lapse sistema

Primo Vision WOW dish VITRO LIFE gojitvena posodica (Slika 16) je posebej oblikovana za Primo Vision sistem in služi za gojenje posamičnega zarodka ter njegovo spremljanje s time-lapse mikroskopijo. Gre za razporeditev ločenih in označenih mikro vdolbinic v posodici, kar omogoča enostavno regulacijo, spremljanje in identifikacijo zarodkov.

V kulturi zarodkov so lahko vsi zarodki kot skupina gojeni v eni vdolbini gojilne posode, kar zagotavlja optimalno okolje gojenja celotni skupini zarodkov, medtem ko ločene mikro vdolbinice omogočajo posameznim zarodkom, da si sami ustvarijo svoje stabilno mikrookolje.



Slika 15: Primo Vision WOW dish VITRO IIFE gojitvena posodica

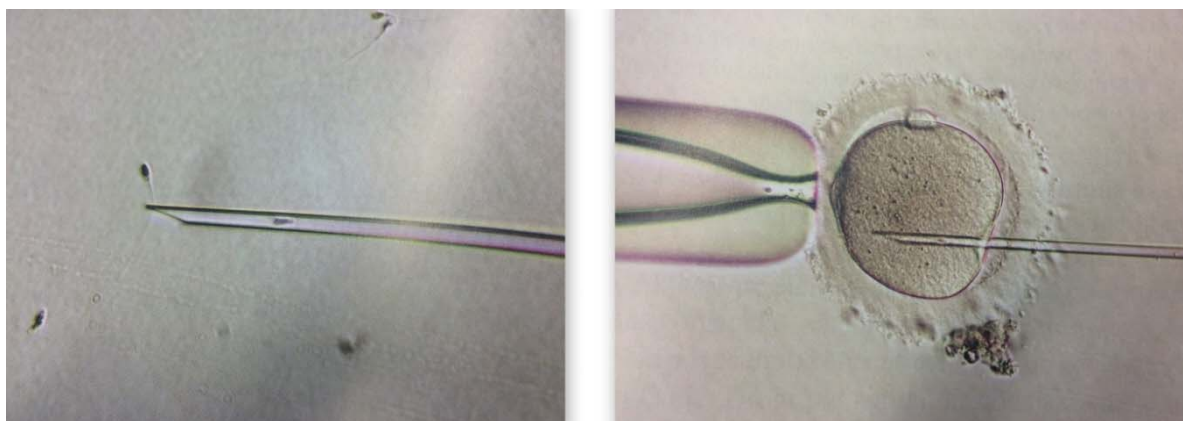
(<http://www.vitrolife.com/sv/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/Primo-Vision-Embryo-Culture-Dish/>)

3.5 POSTOPEK ICSI

Postopek neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI) so izvajali izkušeni klinični embriologi v Laboratoriju za oploditev v biomedicinsko pomočjo pod invertnim mikroskopom z mikroorodji oziroma hidravličnim mikromanipulacijskim sistemom. Postopek ICSI je bil izveden na enak način tako pri oploditvi s spermiji iz testisov pacientov z azoospermijo, kot tudi s spermiji iz semenskega izliva pacientov z oligoastenoteratozoospermijo (Slika 16).

Potek:

1. Na drobno nosilno stekleno mikropipeto so previdno prisesali jajčno celico, tako da je bilo polarno telo glede na uro v poziciji 12 ali 6.
2. Iz druge mikropipete so spustili zrak in jo napolnili z medijem Sperm Prep. Mikroinjekcijsko pipeto so potopili v kapljico s spermiji.
3. Z mikropipeto so se s posebno kretnjo dotaknili repa izbranega spermija, da je le-ta obstal (imobilizacija) in ga previdno ujeli v pipeto.
4. Spermij so z mikropipeto injicirali v jajčno celico od strani, glede na urine kazalce, na poziciji 3, čim dlje od polarnega telesa, da ne bi poškodovali (mejotskega) delitvenega vretena. Z mikroinjekcijsko pipeto so predrli ovojnico zono pellucido in membrano jajčne celice. Nekaj citoplazme so vsesali v pipeto, da so se prepričali, da so resnično v citoplazmi jajčne celice. Nato so spermij in citoplazmo počasi spustili v celico.
5. Mikroinjekcijsko pipeto so previdno umaknili iz celice ter jajčno celico spustili iz nosilne pipete.
6. Jajčno celico so nato prestavili v petrijevko z gojiščem.



Slika 16: Imobilizacija spermija in neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI) (Viran-Klun, 2004)

3.6 RAZVOJ ZARODKA IN TIME-LAPSE ANALIZA

Vsak dan smo spremljali razvoj zarodka in ocenjevali kakovost (Priloga A).

Dan po izvedenem postopku ICSI smo določali uspešnost oploditve jajčnih celic. Opljene jajčne celice smo prepoznali po prisotnosti ženskega in moškega pronukleusa (vidna postaneta 10 do 18 ur po oploditvi jajčne celice) in po dveh polarnih telesih v perivitelinskem prostoru. Sekundarno polarno telo je lahko poleg primarnega polarnega telesa ali ločeno od njega. Včasih je njegova ocena težka, saj gre lahko le za fragmentirano primarno polarno telo.

Stopnja oploditve (koliko celic je bilo oplojenih na postopek) je pomemben podatek o uspehu postopka zunajtelesne oploditve.

Opljene jajčne celice smo prestavili so bile prestavljene v sveže gojišče v posodicah. Nadaljevali smo z ocenjevanjem kakovosti oplojenih jajčnih celic oziroma zarodkov na 2., 3., 4. in 5. dan po izvedenem postopku ICSI. Kakovost zarodkov iz manjšega števila celic je bila ocenjena na 2. in 3. dan gojenja glede na delež fragmentacije in obliko celic (blastomer). Slab znak je bila obilna fragmentacija, saj fragmenti zmanjšujejo zmožnost ugnezditev zarodka v maternici. Kakovost zarodkov je bila ocenjena po mednarodno priznani klasifikaciji kakovosti zarodkov. Eden ali največ dva zarodka, ki sta bila najboljše kakovosti, sta bila prenešena v maternico pacientke s posebnim katetrom na tretji ali peti dan.

Kriteriji ocene zarodkov iz manjšega števila celic (Bolton in sod., 1989, cit. po Virant-Klun in sod., 2002):

A – zelo dobra kakovost s pravilno oblikovanimi, okroglimi in med seboj ločenimi blastomerami. Fragmentacije ni ali pa zajema manj kot 10 % volumna zarodka.

B – povprečna kakovost zarodka s pravilno oblikovanimi blastomerami, ki so okrogle in med seboj enake. Pojavlja se do 30 % fragmentov.

C – slaba kakovost zarodka; blastomere so nepravilno oblikovane, niso okrogle in med seboj niso enake. Fragmentacija od 31 do 50 % volumna.

D – zelo slaba kakovost zarodka; blastomere so zelo slabo vidne in težko določimo njihovo obliko. Veliko fragmentov (nad 50 % volumna).

Za podaljšano gojenje zarodkov do razvojne stopnje blastociste se odločamo predvsem, kadar smo pri neplodnem paru pridobili več kvalitetnih zarodkov (običajno več kot trije). Po podaljšanem gojenju prenesemo v maternico samo zarodke na razvojni stopnji blastociste (cca.100 celic) ali morule (cca. 30 celic). Za razvoj morule je bilo potrebno vsaj 4-dnevno gojenje, za razvoj blastociste pa 5-dnevno gojenje zarodkov. Celice blastociste so že bile diferencirane v embrioblast in trofoblast. Sledilo je ocenjevanje blastociste, ki je vključevalo naslednje parametre: stopnjo razvitosti (ekspandiranosti), izluščenje, razvitost embrioblasta in razvitost trofoblasta.

Kriteriji ocene blastocist (Gardner in sod., 2000):

Kategorije od 1 do 6 glede na razvoj zarodka:

Kategorija 1 – zgodnja blastocista, pri kateri votlinica (blastocel) zavzema manj kot polovico volumna zarodka

Kategorija 2 – razvita blastocista, pri kateri blastocel zavzema pol ali več volumna zarodka, volumen zarodka ostaja enak.

Kategorija 3 – razvita blastocista, pri kateri blastocel zavzema celoten volumen zarodka, vendar ostaja volumen zarodka enak.

Kategorija 4 – ekspandirana blastocista. Volumen blastocela je večji od prvotnega blastocela in zona pellucida močno stanjšana. Blastocista izgleda napihnjena

Kategorija 5 – blastocista, ki se lušči (izluščenje). Vsebina zarodka se boči ven iz zone pellucide.

Kategorija 6 – izluščena blastocista. Vsebina blastociste je vsa zlezla iz zone pellucide.

Kakovost embrioblasta:

A – embrioblast je dobro izražen, kompakten in iz veliko tesno skupaj sprijetih celic.

B – embrioblast je slabo izražen, iz manjšega števila celic, ki tvorijo kompaktne skupine.

C – embrioblast iz zelo malo celic.

Kakovost trofektoderma:

A – trofektoderm iz veliko celic, ki so sploščene in tvorijo kohezivni sloj.

B – trofektoderm iz malo celic, ki tvorijo slabo izražen in pretrgan sloj.

C – trofektoderm iz zelo malo velikih celic.

3.7 SPREMLJANJE RAZVOJNE DINAMIKE ZARODKOV Z MIKROSKOPIRANJEM V ČASOVNIH PRESLEDKIH

Spremljanju razvoja zarodkov pod time-lapse mikroskopom (TLM) je sledila analiza razvoja vsakega zarodka posebej. Pri tem smo uporabljali programsko opremo PrimoVision. Opazovani dogodki v razvoju zarodka so bili čas singamije (zlitja pronukleusov) ter pojav faz dvoceličnega, štiriceličnega, šestceličnega, osemceličnega ter večceličnega zarodka do morule oziroma blastociste.

Osredotočili smo se na:

t_0 – čas, pri katerem pride do singamije

t 2C – čas prve delitve, nastanek dvoceličnega zarodka

t 3C – čas nastanka triceličnega zarodka

t 4C – čas nastanka štiriceličnega zarodka

t 5C – čas nastanka petceličnega zarodka

t 6C – čas nastanka šestceličnega zarodka

t 8C – čas nastanka osemceličnega zarodka

t MO – čas nastanka morule

t BL – čas nastanka blastociste

Opazovali smo tudi pojav fragmentacije in refragmentacije. Gre za pojav majhnih razdrobljenih delcev, citoplazmatskih fragmentov, ki so brez jedra (anuklearni). Domneva se, da fragmentacija zarodka predstavlja način za odstranjevanje nenormalnih celic (apoptoza). Fragmenti se lahko pojavljajo v zarodku lokalno ali pa so razpršeni po njem. Bolj fragmentirani zarodki se običajno slabše razvijajo do razvojne stopnje blastociste in imajo manjšo možnost ugnezditve v maternico, vendar to ni pravilo. Fragmentacija v zarodku se ves čas spreminja in fragmenti se lahko zelo na hitro absorbirajo (refragmentacija) (Virant-Klun, 2004). Vse upoštevane in določene faze so bile ovrednotene v urah ter minutah od singamije pri času t_0 . Čas delitve je bil določen ob času, ko je bila novo formirana blastomera popolnoma ločena od sosednje celice.

Primo Vision je programska oprema za mikroskopiranje v časovnih presledkih (TLM) in je temelj za *in vitro* spremljanje zarodkov ter arhiviranje posnetkov, s čimer omogoča pridobitev podatkov razvoja v inkubatorju spremljanih zarodkov. Glavni deli sistema so:

1. Inertna, kompaktna in fiksirana digitalna invertna mikroskopska enota (Primo Vision Digital Mikroskopom), ki je lahko nameščena znotraj vsakega CO₂-inkubatorja.

2. Kontrolna enota za krmiljenje mikroskopa in delovanje programske opreme za analizo Primo Vision, ki se uporabljajo zunaj inkubatorja.
3. "Microwell" (WOW) gojitvena petrijevka za kulture zarodkov.
4. Univerzalno serijsko vodilo USB in napajalni kabli.

Petrijevka z ločenimi mikro vdolbinami za vsak zarodek je bila nameščena v inkubatorju na nosilcu Primo Vision digitalnega mikroskopa (Slika 17). Določili smo časovni zajem (frekvenco) posnetkov razvoja zarodkov *in vitro*. Vsi zarodki so bili vidni na sliki skozi celotno obdobje gojenja. Fokusiranje in fotografiranje zarodkov se je izvajalo izven CO₂-inkubatorja z uporabo programske opreme na zunanji kontrolni enoti. Z mikroskopom posnete slike so se prikazale na zaslonu, priključenem na kontrolno enoto in se arhivirale v posebni podmapi. Sistem omogoča nemoteno gojenje zarodkov v inkubatorju skozi celoten čas razvoja, poleg tega pa tudi nadzor celotnega razvoja *in vitro* in posnetke pomembnih obdobj razvoja zarodka, kar zagotavlja veliko informacij in omogoča izbiro optimalnega zarodka za vstavev v maternico pacientke.

Primo Vision mikroskop je poseben, kompakten, nepredušen, digitalni invertni mikroskop, namenjen za varno in preprosto uporabo v inkubatorju. Ohišje mikroskopske enote vključuje po meri narejen zelo natančen optični sistem, fotoaparati in fine mehanske dele za ostrenje in slikanje. Poleg tega vsebuje lučko in nosilec za gojitveno petrijevko, na zadnji strani ohišja pa ima vhod za mini-USB kabel, preko katerega se mikroskop napaja.



Slika 17: Primo Vision mikroskopska enota sistema time-lapse (Primo Vision – Digital in vitro embryo development monitoring and archiving system; Use and Maintenance Manual. Vitrolife).

Lučka mikroskopa ima majhno intenzivnost svetlobe in sveti le, če je v programski opremi nastavljen način "v živo" ter med samim slikanjem. Vir svetlobe je homogena zelena LED

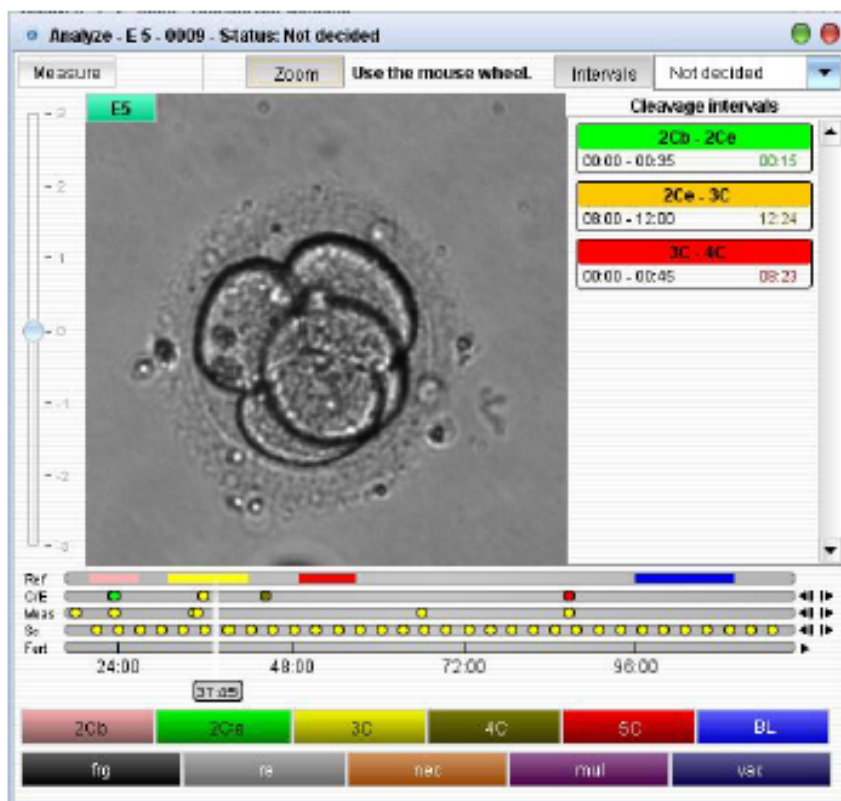
lučka. Optični sistem je zasnovan in harmoniziran za zagotavljanje izjemno visoke ločljivosti na zelo velikem vidnem polju ter omogoča varen in nemoten razvoj zarodkov.

Primo Vision "capture" programska oprema omogoča individualen nadzor Primo Vision mikroskopa, nastavitvitev jakosti svetlobe, določitev frekvence zajema slik in arhiviranje vseh posnetih fotografij v podmapo, ki se samodejno ustvari. Programska oprema omogoča možnost oddaljenega dostopa, nastavitvitev ostrenja, slikanje v različnih ravninah in povečave individualnega zarodka.

Primo Vision "analyzer" programska oprema zagotavlja dodatne funkcije za ročno analizo razvoja zarodka. Slike, dobljene s programsko opremo za zajemanje, so samodejno shranjene in se lahko uporabijo za nastanek videa, na podlagi katerega sledimo in določamo čas delitev ter pomembnih dogodkov v razvoju zarodka, kot so: neenakomerna delitev, fragmentacija, reabsorbcija celičnih fragmentov, večjedernost, vakuolizacija itd.

V programu smo izbrali željeni zarodek in s klikom na ukaz za analizo začeli z analizo razvoja vsakega posameznega, s TLM spremljanega zarodka. Z izbiro ukaza "play" se je predvajal video posnetek razvoja zarodka. Prav tako je bilo možno slediti razvoju zarodka tudi po posameznih slikah videa. V nastavitvah smo nastavili dogodke, ki smo jih želeli označevati in s sledenjem razvoja po posameznih slikah, narejenih v določenih frekvencah, določali čas od singamije pri t_0 . Spremljali smo čas pojava dveh, treh, štirih, petih, šestih in osmih celic ter morule in blastociste. Poleg tega smo opazovali, ali so se pri zarodkih pojavili fragmenti in kdaj ter ali je prišlo do reabsorbcije fragmentov in kdaj. Pozorni smo bili tudi na pojav nekroznih in večjedrnih celic, a je bilo takšnih opaženih primerov malo. Vsaka spremljana razvojna stopnja zarodka je bila v spodnji vrstici označena s svojo barvo. Ob določenem času, natančno, ko je prišlo do določene faze v razvoju zarodka, je bilo potrebno s klikom označiti ustrezen dogodek v spodnji vrstici. Program je v vrsti zgoraj s piko označil čas, pri katerem je prišlo do določene faze razvoja. Tako smo označevali čas, pri katerem je prišlo do vsake posamezne stopnje v razvoju zarodka vse do konca (do tretjega oziroma petega dne razvoja zarodka). Podatki so bili shranjeni avtomatsko in jih je bilo moč izvoziti v obliki tabele, kjer so bili zapisani posamezni časi, ki smo jih ročno določili/označili (Slika 18).

Ker so bile slike z mikroskopom posnete v različnih fokalnih globinah, je bilo možno opazovati zarodek v različnih ravninah, prav tako pa smo lahko sliko tudi povečali.



Slika 18: Odprto okno Primo Vision "analyzer" programske opreme, kjer smo spremljali razvoj posameznega zarodka in označevali čas pojava posameznih dogodkov (Primo Vision – Digital in vitro embryo development monitoring and archiving system. Use and Maintenance Manual, Vitrolife)

3.8 PRENOS ZARODKA V MATERNICO

V maternico pacientke smo s posebnim katetrom prenesli enega do največ dva zarodka. Zarodka smo v majhnem volumnu gojišča aspirirali v kateter in ju ob sodelovanju z ginekologom previdno izbrizgali v maternico. Pri vsakem paru smo izbrali enega do dva najbolj kakovostna zarodka glede na morfolologijo. Pri parih oziroma pacientih z azoospermijo (TESE) smo zarodke glede na ustaljeno klinično prakso prenesli v maternico na dan 3. Zarodki so bili iz manjšega števila celic. Preostale zarodke pa smo gojili do 5. dne, do razvojne stopnje blastociste za morebitno zamrzovanje in shranjevanje za kasnejši prenos v maternico. Pri parih z oligoastenoteratozoospermijo (OAT) pa smo vse zarodke gojili do 5. dne in v maternico prenesli eno ali dve blastocisti ali moruli, preostale blastociste pa zamrznili za kasnejšo uporabo. Dva tedna po prenosu zarodkov je bil opravljen biokemični test na nosečnost (betaHCG v krvi) in še dva tedna kasneje potrditev klinične nosečnosti (gestacijske vrečke in utripanje srčka) z ultrazvokom. Stopnja zanositve je bila izražena kot delež zanositev na postopek.

3.9 PACIENTI IN ZARODKI, VKLJUČENI V RAZISKAVO

Povprečna starost žensk, katerih jajčne celice smo pridobili za postopek ICSI s spermiji iz skupine OAT, je bila 33 let, povprečna starost žensk, katerih jajčne celice so bile pridobljene za postopek ICSI s spermiji iz skupine TESE, pa je bila 38 let.

Skupno smo v OAT skupini (oploditev s spermiji iz ejakulata pri pacientih z oligoastenoteratozoospermijo) pridobili 38 zarodkov, v TESE skupini (oploditev s spermiji iz testisa pri pacientih z neobstruktivno azoospermijo) pa 31 zarodkov. Pri vsakem paru smo enega do dva zarodka gojili v sistemu za spremljanje dinamike razvoja pod mikroskopom (time-lapse mikroskopija), preostale zarodke pa smo gojili na običajen način. Ugotavljali smo dejavnike, ki so vplivali na razvoj zarodkov do blastociste v celotni skupini zarodkov. Med seboj smo primerjali s time-lapse mikroskopijo spremljano dinamiko razvoja zarodkov obeh skupin – zarodke OAT in TESE. S time-lapse mikroskopom je bilo spremljanih in v programu PrimoVison analiziranih 16 zarodkov pri 8 parih z OAT ter 12 zarodkov pri 7 parih z azoospermijo oziroma TESE. Dinamika razvoja obeh skupin zarodkov je bila spremljana do 3. dne razvoja, pri zarodkih OAT pa tudi do 5. dne razvoja. Dinamika razvoja zarodkov je bila ugotavljana glede na izvor spermijev (OAT – ejakulat vs. TESE – testis). Spremljali smo morfologijo zarodka (oblika celic, fragmentacija) na 3. dan in razvoj do blastociste.

Raziskava je potekala v okviru dovoljenja Komisije za medicinsko etiko, za time-lapse mikroskopijo na zarodkih v programu zunajtelesne oploditve (referenca: 140/01/11).

3.10 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Vse podatke o pacientih in pridobljene podatke o razvoju zarodkov (ocene kakovosti zarodkov; oblika blastomer in fragmentacija zarodkov na 3. in 5. dan, podatke o v maternico prenešenih zarodkih, o razvojno zaustavljenih (štopiranih) zarodkih in zanositvah ter vse časovne podatke o dinamiki razvoja zarodkov, spremljanih s time-lapse mikroskopom) smo smiselno in sistematično vnesli v skupno tabelo, ki smo jo uporabili za statistično analizo. Za statistično obdelavo podatkov je bil uporabljen program IBM SPSS Statistics v. 21. Za primerjavo časov med skupinama oziroma za statistično primerjavo dinamike razvoja TESE in OAT zarodkov smo uporabili Studentov t-test, za ugotovitev vpliva ostalih dejavnikov na razvoj do blastociste (starost ženske, število oplojenih jajčnih celic, stopnja fragmentacije, oblika blastomer) pa Hi-kvadrat test. Za stopnjo značilnosti oziroma statistično značilnost rezultatov smo uporabili 5 % tveganje ($p < 0,05$).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Dobljeni rezultati razvoja zarodkov in dinamike njihovega razvoja so prikazani v obliki tabel in grafov. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni (SD). Pri dinamiki razvoja gre za čas v urah, ki so ga zarodki potrebovali do določene faze razvoja od singamije naprej. Razvoj zarodkov pod time-lapse mikroskopskim sistemom je bil spremljan pri 16 zarodkih iz skupine OAT in 12 zarodkih iz skupine TESE.

Izmed petnajstih obravnavanih parov (osem parov s pacienti z OAT in sedem parov z izvedenim posegom TESE) je pri 33,3 % prišlo do zanositve, od tega pri treh primerih OAT (37,5 %) in dveh primerih TESE (28,5 %). To je dober klinični rezultat, ki kot predhodne raziskave nakazuje, da time-lapse mikroskopija ne vpliva kvarno na zarodke in izid postopka zunajtelesne oploditve.

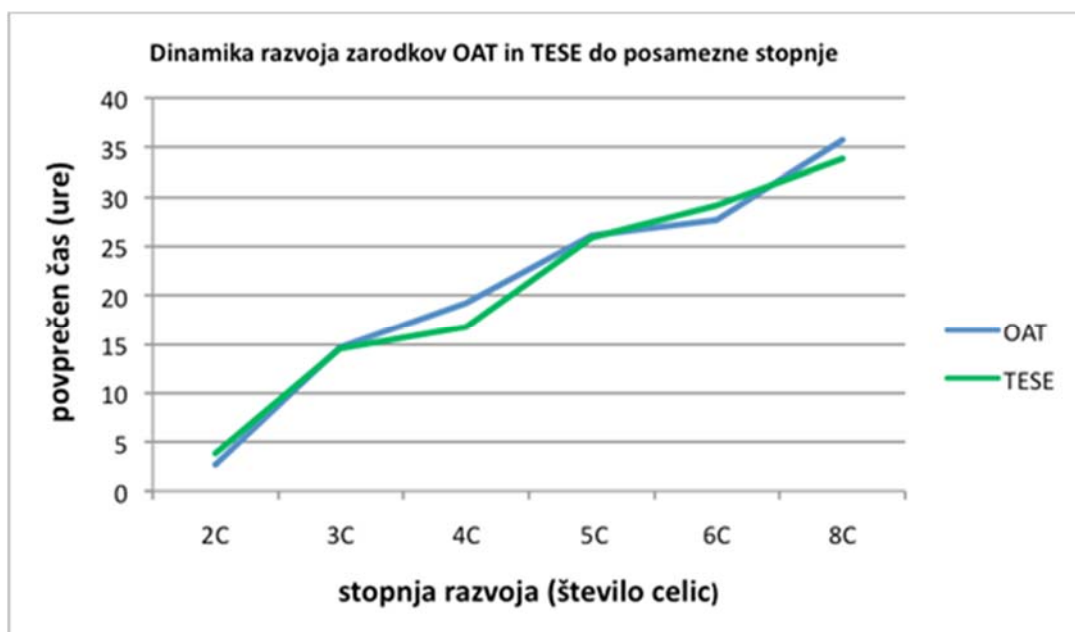
4.1 DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV, DOBLJENIH Z ICSI S SPERMIJI IZ EJAKULATA IN S SPERMIJI IZ TESTISOV

Razvoj zarodka je izjemen iz različnih razlogov, med drugim tudi tega, da jajčna celica približno vse do tretjega dne zagotavlja vse vire za opravljanje kompleksnih razvojnih poti, v odsotnosti transkripcije. Nadaljnje reprogramiranje, ki se pojavi v transkripcijskem mirovanju, vključuje enega bolj zahtevnih setov kromosomov – kromosome, prevzete od spermijev, ki so visoko kondenzirani in metilirani ter organizirani okrog protaminov (Pera, 2011). Ravno v tem obdobju razvoja se je v večini primerov pokazala sprememba v dinamiki razvoja zarodkov iz skupine TESE. Če so se ti do stopnje dveh celic razvijali počasneje, so se nato do stopnje treh ali štirih celic začeli razvijati hitreje. Sledi stopnja štirih celic, ki pa je obdobje, ko zarodek iz transkripcijskega mirovanja prične z aktivacijo lastnega genoma. Po Balalan in sod. (2001) pa je ravno čas po aktivaciji genoma zarodka, po pojavu prvih parentalnih transkripcijskih produktov, čas, ko se najbolj kaže očetov vpliv na razvoj zarodka.

Pri primerjavi dinamike razvoja med 16 zarodki iz skupine OAT in 12 zarodki iz skupine TESE ni bilo statistično značilnih razlik, kot je razvidno iz slik 19 in 20 oziroma preglednic 5 in 6. Zarodki so imeli zelo primerljivo dinamiko razvoja, kar lahko razloži dober klinični rezultat tako z eno kot drugo skupino zarodkov. Kljub temu se kažejo nekatere minimalne razlike (Slika 19). Ker je aktivacija zarodkovega genoma povezana z reorganizacijo kromatina, ki ga tvorijo DNK in proteini histoni, bi pričakovali, da se razlike kažejo v tem obdobju zarodkovega razvoja, to je na razvojni stopnji 4 do 6 celic. Ravno na tej stopnji pa pride tudi do spremembe dinamike razvoja zarodkov po TESE. Če pogledamo natančneje, vidimo, da so se zarodki iz skupine TESE od singamije do dvocelične stopnje povprečno razvijali počasneje, z razliko ene ure. Razvoj do tri-celične

stopnje je pri obeh skupinah trajal povprečno 14,5 ur (Preglednica 5). Pri primerjavi razvoja med skupinama in med posameznimi stopnjami, od 2 – 4 celic, od 4 – 6 celic oziroma od 5 celic do osemceličnega zarodka, lahko vidimo, da so zarodki po TESE od 2 do 4-celične faze potrebovali povprečno skoraj tri ure manj kot skupina zarodkov OAT. Zanimivo pa je, da so se pri prehodu zarodka iz 4 v 6 celični stadij, oziroma iz 5 v 8 celic, TESE zarodki razvijali počasneje, sicer z minimalno razliko ene ure (Preglednica 6 in Slika 20).

Znano je, da se pri sesalcih diferenciacija spermijev ne konča v testisu. Spermiji nadaljujejo svojo pot v epididimis, kjer se shranjujejo in nadalje zorijo, čeprav so tudi v testisih že gibljivi. Tudi spermiji, sproščeni med ejakulacijo, še nimajo zmogljivosti vezave in oploditve jajčne celice. Končne stopnje zorenja spermijev in kapacitacija se pri sesalcih zgodijo šele, ko se spermij nekaj časa že nahaja v reprodukcijskem traku ženske oz. samice. Ker zrelost spermija vpliva na razvoj zarodka, smo pričakovali, da se bo dinamika razvoja zarodkov, ki so nastali s spermiji, pridobljenimi iz testisov, razlikovala od zarodkov, ki so nastali s spermiji iz ejakulata pacientov z oligoastenoteratozoospermijo (OAT). Spermiji, izolirani iz testisov, namreč niso popolnoma dozoreli. Nezreli spermiji pa lahko imajo nepravilne nukleoproteinske vzorce in porušeno integriteto molekul DNK. Spermatidina DNK postane tekom razvoja in zorenja močno kondenzirana in obdana z nukleoproteinskimi protamini, ki zamenjajo predhodne histone. Če zamenjava histonov s protamini ni zadostna, se oploditvena sposobnost spermijev zmanjša. Ni izključeno, da spermiji med procesiranjem v laboratoriju in inkubiranjem v CO₂-inkubatorju dozoriijo. V tem delu se določene razlike sicer kažejo (sprva je dinamika zarodkov TESE hitrejša, premik od stopnje štirih celic do šestih celic oziroma petih do osmih celic pa traja nekoliko dalje, v primerjavi s skupino OAT. Od singamije do faze 8-celičnega zarodka so zarodki po TESE potrebovali približno dve uri manj kot zarodki OAT, vendar je vrednost $p > 0,05$ in rezultati niso statistično značilno različni.



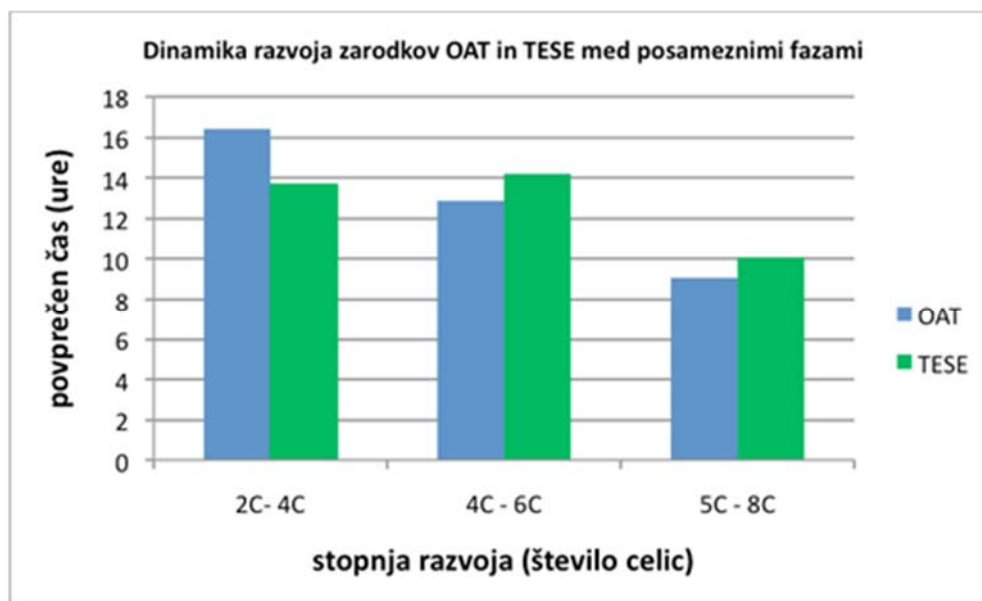
Slika 19: Grafični prikaz dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE do posamezne faze razvoja.

Preglednica 5: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE do posamezne faze razvoja.

Stopnja (št. celic)	OAT		TESE		p vrednost
	Povprečen čas v urah	SD	Povprečen čas v urah	SD	
2C	2,6458	1,05035	3,7917	3,17115	0,187
3C	14,5726	4,82239	14,4697	6,82431	0,965
4C	19,0646	17,42044	16,7077	9,33849	0,665
5C	25,9678	4,67517	25,8350	6,92896	0,955
6C	27,5833	4,25408	29,0306	5,37785	0,451
8C	35,7269	11,30776	33,8354	8,29912	0,687
MO	61,7288	12,57488	/	/	
BL	77,4093	5,30318	/	/	

Preglednica 6: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE med posameznimi stopnjami razvoja.

SKUPINA		t 2C – 4C [h]	t 4C – 6C [h]	t 5C – 8C [h]
OAT	Povprečje	16,42	12,87	9,07
	N	16	14	13
	SD	17,527	3,587	9,610
TESE	Mean	13,67	14,20	10,10
	N	12	12	7
	SD	6,659	5,007	9,923
p vrednost		0,611	0,440	0,825



Slika 20: Grafični prikaz dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE med posameznimi razvojnimi stopnjami

4.2 DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV GLEDE NA NJIHOVO KAKOVOST NA 3. DAN, VKLJUČNO S FRAGMENTACIJO

Poleg splošne primerjave dinamike razvoja do posameznega stadija zarodkov, smo gledali tudi razlike v dinamiki razvoja, glede na oceno kakovosti zarodkov na tretji dan razvoja (delež fragmentacije in obliko celic – blastomer). Izmed 31 ocenjenih zarodkov iz skupine TESE je bilo s kakovostjo AA (dobra kakovost; dobra morfologija embrioblasta in

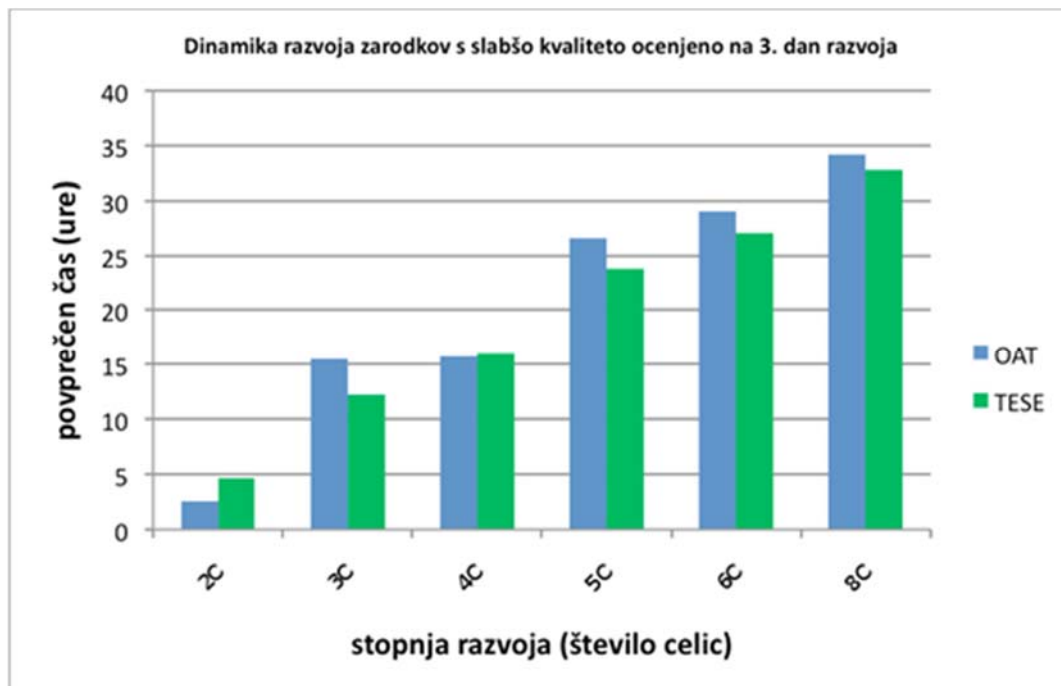
trofoblasta) ocenjenih 14 zarodkov (45 %), izmed 38 zarodkov OAT pa 21 zarodkov (55 %). Razlika ni bila statistično značilna. Ostali zarodki so bili slabše kakovosti; AB / BA / BB / BC / CB / CC.

Tudi glede na morfologijo zarodkov na 3. dan nismo med OAT in TESE zarodki ugotovili nobenih statistično značilnih razlik v dinamiki razvoja zarodkov. Kljub temu smo pri razvoju zarodkov z ocenjeno poslabšano kakovostjo na 3. dan opazili nekatere razlike v dinamiki razvoja med obema skupinama zarodkov. Od singamije do dvočelične stopnje zarodka, je razvoj zarodkov z ocenjeno slabšo kakovostjo zarodka AB / BA / BB / BC / CB / CC na tretji dan razvoja, razvitih po oploditvi s spermiji pacientov z azoospermijo (TESE) potekal počasneje kot pri OAT zarodkih. Zarodki so do te stopnje potrebovali povprečno kar 5 ur, med tem ko OAT zarodki le 3 ure. Razvoj do stopnje štirih celic je pri skupini TESE trajal povprečno 18 ur, kar je 7 ur manj v primerjavi s skupino OAT. Ponovno pa je prišlo do preobrata na stopnji razvoja od 4 – 6 celic, kjer je v primerjavi z OAT razvoj zarodkov skupine TESE ponovno počasnejši, in sicer dobrih 5 ur (Preglednica 7 in Slika 21).

Razvoj zarodkov dobre kakovosti, ocenjenih z AA (pravilno oblikovane, okrogle in med seboj ločene blastomere, brez fragmentacije ali pa s fragmentacijo, ki zavzema manj kot 10 % volumna), je pri obeh skupinah potekal s podobno dinamiko v razvoju (Preglednica 8). Heterogenosti je bilo manj kot pri zarodkih slabše kakovosti. Zarodki TESE so bili v razvoju od 4 – 6 celic počasnejši za tri ure (TESE so potrebovali 15 ur, zarodki skupine OAT pa 12 ur) (Slika 22), vendar, kot smo že omenili, rezultati niso bili statistično značilni, $p > 0,05$.

Preglednica 7: Dinamika razvoja zarodkov s slabšo kakovostjo, ocenjeno na 3. dan razvoja

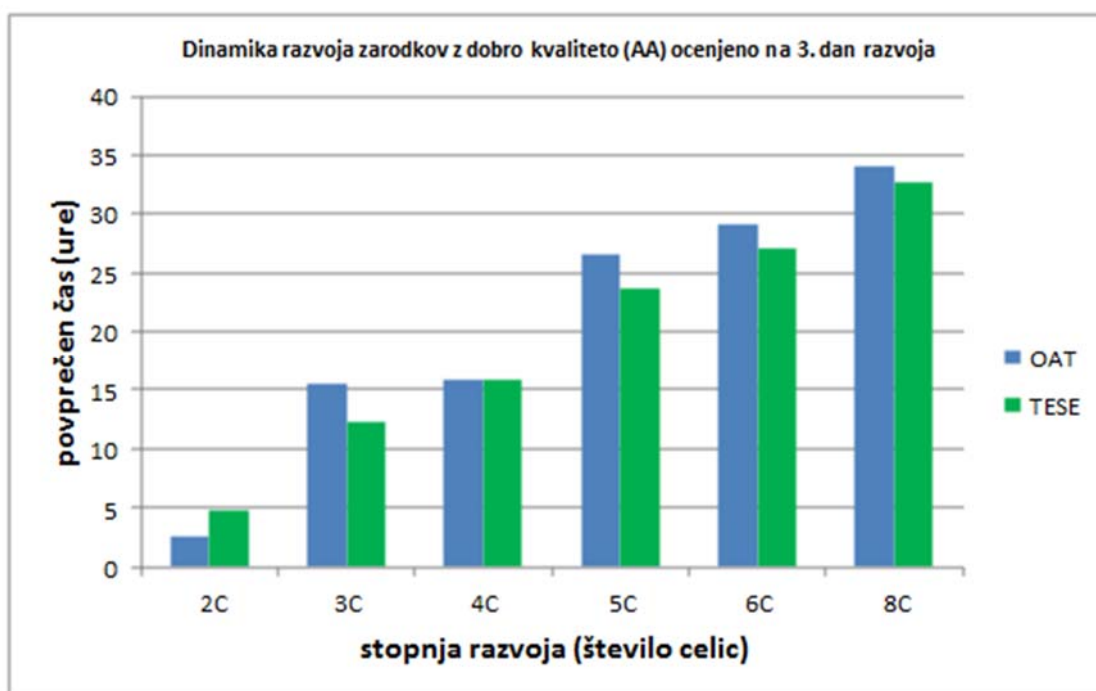
Povprečen čas v urah								
SKUPINA	t 2C [h]	t 3C [h]	t 4C [h]	t 5C [h]	t 6C [h]	t 8C [h]	t MO [h]	t BL [h]
OAT Povprečje	3,1905	16,2778	25,0024	26,4722	29,2500	40,9533	62,0292	78,5375
SD	1,39917	7,05350	26,14334	5,08420	3,26216	16,41696	20,41737	6,76537
TESE Povprečje	5,1389	14,7500	18,2643	25,2222	28,0556	32,7500		
SD	4,21165	9,57413	12,92872	6,27399	6,86834	10,44696	/	/
Skupaj Povprečje	4,0897	15,5139	21,6333	25,8472	28,6528	37,3074	62,0292	78,5375
SD	3,06459	8,05707	20,12014	5,48343	5,16420	13,94196	20,41737	6,76537
p vrednost	0,271	0,759	0,552	0,712	0,708	0,417	/	/



Slika 21: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE s slabšo kakovostjo, ocenjeno na 3. dan razvoja.

Preglednica 8: Dinamika razvoja zarodkov z dobro kakovostjo (AA), ocenjeno na 3. dan razvoja.

SKUPINA	Povprečen čas v urah							
	t 2C [h]	t 3C [h]	t 4C [h]	t 5C [h]	t 6C [h]	t 8C [h]	t MO [h]	t BL [h]
OAT Povprečje	2,2222	13,2937	14,4463	25,6315	26,3333	32,4604	61,5571	76,5067
N	9	8	9	9	8	8	7	5
SD	0,37268	1,81392	1,24872	4,66652	4,67346	5,78646	7,41736	4,43041
TESE Povprečje	2,4444	14,1333	14,8917	26,7542	30,0056	34,9208	/	/
N	6	5	6	4	6	4	/	/
SD	0,17213	1,26051	1,16875	8,74924	3,76446	6,95908	/	/
Skupaj Povprečje	2,3111	13,6167	14,6244	25,9769	27,9071	33,2806	61,5571	76,5067
N	15	13	15	13	14	12	7	5
SD	0,32038	1,62164	1,19577	5,82630	4,55716	5,99857	7,41736	4,43041
p vrednost	0,199	0,387	0,500	0,764	0,141	0,529	/	/



Slika 22: Primerjava dinamike razvoja zarodkov OAT in TESE z dobro kakovostjo (AA), ocenjeno na 3. dan razvoja.

Nadalje smo primerjali zarodke iz obeh skupin OAT in TESE glede na samo stopnjo fragmentacije. Pri analizi razvoja zarodkov v programu Primo Vision "analyzer" smo opazili, da je pri nekaterih zarodkih, kjer so bili med razvojem opaženi fragmenti, kasneje prišlo do refragmentacije zarodka (absorbicija fragmentov). To kaže na to, da je razvoj zarodkov zelo dinamičen proces, med katerim se fragmenti lahko pojavljajo in izginevajo. Razvoj zarodkov, ocenjenih na 3. dan, s fragmentacijo B oziroma C, to je s fragmentacijo večjo od 10 % volumna, je potekal do faze dveh celic hitreje pri zarodkih iz skupine OAT (povprečno dve uri hitreje) kot pri TESE zarodkih, vendar razlike niso bile statistično značilne. Razvoj zarodkov TESE od singamije do prve celične delitve je trajal povprečno kar 4,7 ure. Nadalje je bil razvoj zarodkov od 2 – 3 celične faze hitrejši pri skupini TESE kot pri OAT zarodkih, s 5,5 urno razliko (Preglednica 9). Razvoj zarodkov je od petcelične stopnje do osemcelične stopnje pri skupini TESE potekal nekoliko počasneje (Slika 23). Opisane razlike pa niso bile statistično značilne, $p > 0,05$.

Pri primerjavi dinamike razvoja zarodkov iz obeh skupin, OAT in TESE, s fragmentacijo ocenjeno z A (brez fragmentacije ali fragmentacijo, ki je predstavljala manj kot 10 % volumna), na tretji dan razvoja, ni bilo opaženih razlik. Hitrost razvoja teh zarodkov je potekala z enako dinamiko in brez večjih razlik pri razvoju iz ene faze v drugo. Rezultati niso statistično značilni, $p > 0,05$ (Preglednica 10, Slika 24).

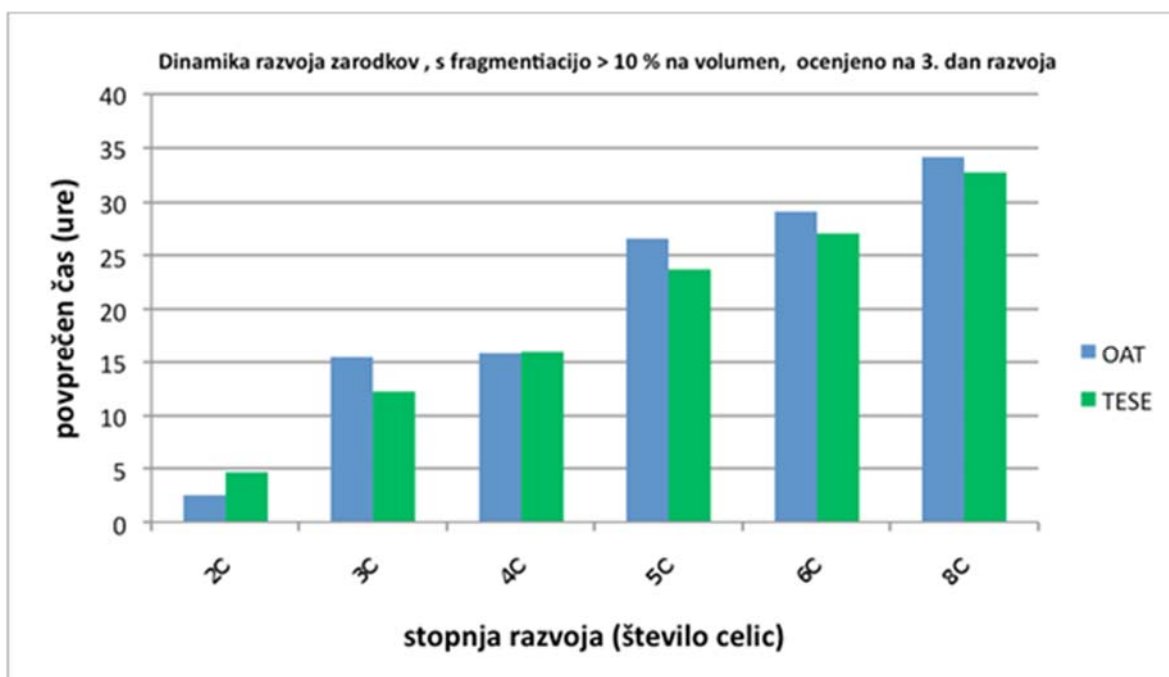
Pri zarodkih, ki so bili ocenjeni z AA oziroma s fragmentacijo A, ne glede na obliko blastomer, ni bilo opaženih večjih razlik v dinamiki razvoja med OAT in TESE zarodki.

Zarodki iz skupine TESE so se konstantno razvijali malenkost počasneje (povprečno z razliko ene ure).

Pri zarodkih s slabšo kakovostjo iz skupine TESE in tudi s fragmentacijo > 10 %, ne glede na obliko blastomer, smo opazili veliko razlik v času od singamije do prve celične delitve (do nastanka dveh celic) v primerjavi z ostalimi zarodki z ocenjeno kakovostjo AA oziroma fragmentacijo A. To lahko potrди model, ki ga je predlagala Pera s sod. (2011). Ta pravi, da imajo zarodki z natančnimi časovnimi okviri v citokinezi in mitozii med prvima dvema delitvama veliko večjo možnost uspešnega razvoja v blastocisto. Model opisuje, da oblikovanje blastomer kolektivno napovedujejo trije parametri – trajanje prve citokineze, čas med koncem prve in začetkom druge delitve ter sinhronost pri drugi delitvi (2 do 4 celice).

Preglednica 9: Dinamika razvoja zarodkov s fragmentacijo, večjo od 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan njihovega razvoja.

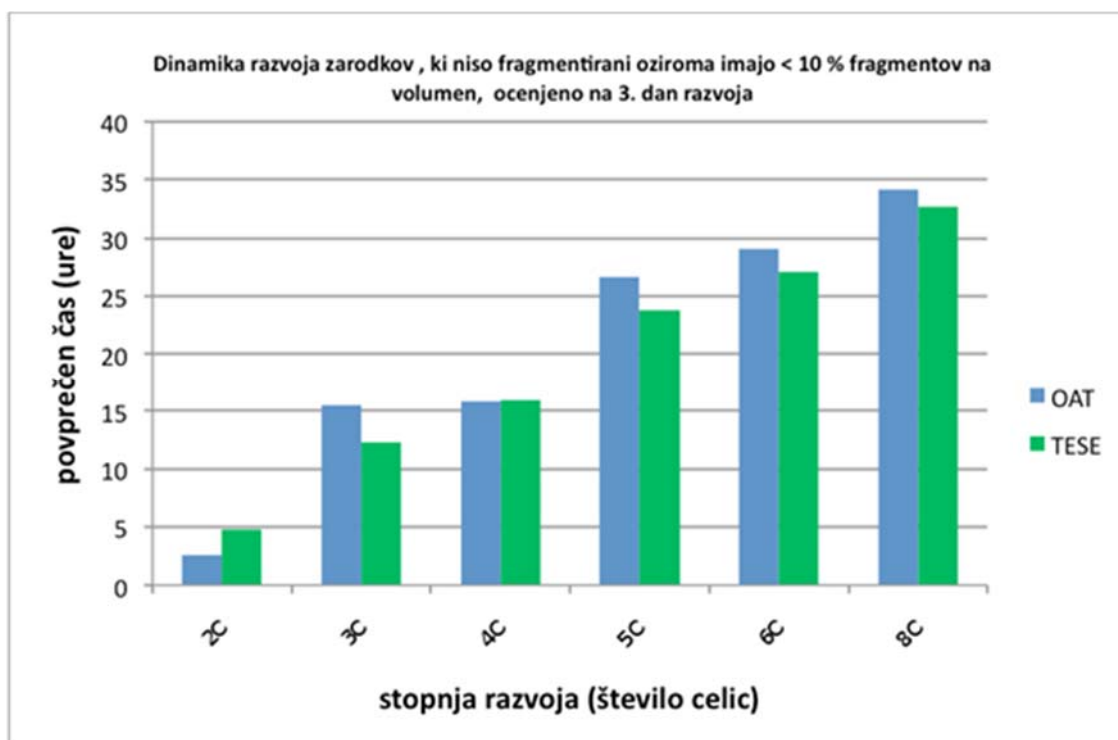
SKUPINA		Povprečen čas v urah							
		t 2C [h]	t 3C [h]	t 4C [h]	t 5C [h]	t 6C [h]	t 8C [h]	t MO [h]	t BL [h]
OAT	Povprečje	2,5556	15,5000	15,7778	26,6111	29,0556	34,1111	63,9278	80,2667
	N	3	2	3	3	3	3	3	3
	SD	0,19245	0,23570	2,45704	4,44826	3,21599	4,40118	24,56980	7,12147
TESE	Povprečje	4,7000	12,2333	15,9194	23,7333	27,0667	32,7500		
	N	5	5	6	5	5	4	/	/
	SD	4,55278	8,19010	12,42565	5,70769	7,18563	10,44696		
Skupaj	Povprečje	3,8958	13,1667	15,8722	24,8125	27,8125	33,3333	63,9278	80,2667
	N	8	7	9	8	8	7	3	3
	SD	3,40864	8,39923	23,38710	5,14661	5,78959	7,84573	24,56980	7,12147
p vrednost		0,390	0,238	0,290	0,487	0,674	0,843	/	/



Slika 23: Dinamika razvoja zarodkov, kjer je fragmentacija večja od 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan njihovega razvoja

Preglednica 10: Dinamika razvoja zarodkov, kjer fragmentacije ni ali pa je manjša kot 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan razvoja

SKUPINA		Povprečen čas v urah							
		t 2C [h]	t 3C [h]	t 4C [h]	t 5C [h]	t 6C [h]	t 8C [h]	t MO [h]	t BL [h]
OAT	Povprečje	2,6667	13,1227	14,5014	25,8069	27,1818	36,2117	60,9042	75,9806
	N	12	11	12	12	11	10	8	6
	SD	1,22268	2,80676	2,73262	4,90709	4,54206	12,84723	7,11116	4,16697
TESE	Povprečje	3,1429	16,3333	17,3833	27,9367	30,4333	34,9208		
	N	7	6	7	5	7	4		
	SD	1,85450	5,50555	6,67811	8,02517	3,61805	6,95908		
Skupaj	Povprečje	2,8421	14,2559	15,5632	26,4333	28,4463	35,8429	60,9042	75,9806
	N	19	17	19	17	18	14	8	6
	SD	1,45453	4,11061	4,63346	5,80139	4,40635	11,21643	7,11116	4,16697
p vrednost		0,507	0,127	0,199	0,508	0,131	0,855	*	*



Slika 24: Dinamika razvoja zarodkov, kjer fragmentacije ni ali pa je manjša od 10 % volumna, ocenjeno na 3. dan razvoja.

4.3 DEJAVNIKI VPLIVA NA RAZVOJ ZARODKOV DO RAZVOJNE STOPNJE BLASTOCISTE

Statistična analiza je pokazala, da je bila kakovost zarodkov na 3. dan statistično značilno povezana z razvojem zarodkov do razvojne stopnje blastociste. Tako število celic kot oblika celic zarodka na 3. dan sta bila statistično značilno povezana z razvojem zarodkov do blastociste ($p = 0,036$ in $p = 0,047$) (Preglednica 11 in Preglednica 12). Vidna je bila tudi težnja po vplivu fragmentacije zarodka na 3. dan, na razvoj do blastociste ($p = 0,066$), medtem ko ni bilo nobenega vpliva starosti ženske in števila oplojenih jajčnih celic v postopku zunajtelesne oploditve na razvoj zarodkov do blastociste (Preglednica 11 in Preglednica 13).

Preglednica 11: Razvoj zarodkov do blastociste (da / ne) glede na starost ženske, število oplojenih jajčnih celic (JC) v postopku in število celic zarodka na 3. dan razvoja.

RAZVOJ DO BLASTOCISTE		STAROST ŽENSKE	ŠT. OPLOJENIH JC	ŠT. CELIC NA 3. DAN
DA	Povprečje	35,53	6,62	6,62
	N	60	60	60
	SD	6,701	4,068	1,786
NE	Povprečje	34,22	7,67	8,00
	N	9	9	8
	SD	5,826	4,093	0,926
p vrednost		0,580	0,473	0,036

Preglednica 12: Stopnja razvoja zarodkov do blastociste glede na oceno oblike blastomer na 3. dan razvoja

Ocena oblike blastomer 3. Dan		Razvoj do blastociste	
		NE	DA
A	N	41	7
	Delež zarodkov v %	85,4%	14,6%
B	N	17	1
	Delež zarodkov v %	94,4%	5,6%
C	N	2	0
	Delež zarodkov v %	100,0%	0,0%
p vrednost = 0,047			

Preglednica 13: Stopnja razvoja zarodkov do blastociste (skupina OAT) glede na oceno fragmentacije na 3. dan razvoja

Ocena fragmentacije na 3. dan		Razvoj do blastociste	
		NE	DA
A	N	41	6
	Delež zarodkov v %	85,4%	12,8%
B	N	16	2
	Delež zarodkov v %	88,9%	11,1%
C	N	3	0
	Delež zarodkov v %	100,0%	0,0%
p vrednost = 0,066			

V OAT skupini se je statistično značilno več zarodkov razvilo do razvojne stopnje blastociste kot v TESE skupini ($p = 0,004$) (Preglednica 14). Ker ni bilo vpliva starosti ženske na razvoj zarodkov do blastociste, je bilo to zelo verjetno povezano z izvorom spermijev (ejakulat vs. testis). Pri tem pa je potrebno upoštevati, da prenešenih zarodkov TESE nismo gojili do razvojne stopnje blastociste; najboljši zarodki so bili sistematsko prenešeni v maternico na 3. dan, le nadštevilni zarodki TESE (tudi zarodki slabše kakovosti) pa so bili gojeni do razvojne stopnje blastociste.

Preglednica 14: Stopnja razvoja zarodkov do blastociste glede na izvor spermijev (OAT/TESE)

IZVOR SPERMIJEV		Razvoj do blastociste	
		NE	DA
OAT	N	29	9
	Delež zarodkov v %	76,3%	23,7%
TESE	N	31	0
	Delež zarodkov v %	100,0%	0,0%
p vrednost = 0,004			

4.4 DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV GLEDE NA RAZVOJ DO BLASTOCISTE

Med zarodki, katerih razvoj je bil s sistemom time-lapse spremljan vse do stopnje blastociste, so bili zgolj predstavniki skupine OAT, saj zarodkov TESE nismo gojili do razvojne stopnje blastociste (doktrina na Ginekološki kliniki). Zarodki so bili sistematsko prenešeni v maternico na 3. dan, le višek zarodkov pa je bil gojen do razvojne stopnje blastociste in zamrznjen oziroma shranjen v tekočem dušiku za kasnejši prenos v maternico. Opazili smo, da so zarodki iz skupine OAT na peti dan, ko je bila ponovno ocenjena njihova kakovost, v večini primerov (60,5 %) dosegli stopnjo blastociste ali pa so prišli vsaj do faze morule. Pri večini zarodkov TESE se je razvoj na peti dan ustavil in so imeli približno 10 celic. Potrebno pa je upoštevati, da so bili nekateri zarodki najboljše kakovosti na tretji dan preneseni, zato ne vemo, do katere stopnje bi prišli do petega dne. Že ta razlika nam kaže na splošno slabši razvoj zarodkov TESE do blastociste. Kaže, da bi se v nadaljnih študijah bilo smiselno osredotočiti na kasnejši razvoj zarodkov, to je od štiri ali petcelične stopnje do blastociste.

Delež zarodkov OAT, ki so se razvili do stopnje blastociste, je bil premosorazmeren z ocenjeno stopnjo fragmentacije na tretji dan. Pri zarodkih, z največjo stopnjo fragmentacije, ocenjenih s C (fragmentacija od 31 % do 50 % volumna), med spremljanjem razvoja s time-lapse mikroskopom ni prišlo do razvoja do blastociste v nobenem primeru. Zarodki, ki so se razvili do blastociste, so do stadija štiriceličnega

zarodka potrebovali povprečno 15 ur, medtem ko so zarodki, ki med opazovanjem s time-lapse sistemom niso dosegli stopnje blastociste, potrebovali več časa-dobrih 19 ur. Zarodki, ki so se razvili do stopnje blastociste, so od singamije do stopnje osmih celic potrebovali povprečno dobri dve uri manj v primerjavi z zarodki, ki niso dosegli stopnje blastociste. Zarodki, ki niso dosegli faze blastociste so bili v razvoju od 2 do 4 celic 4 ure počasnejši kot zarodki, ki so se razvili do blastociste, razvoj od 4 do 6 celic pa je bil počasnejši za dobri 2 uri. Rezultati niso bili statistično značilni, $p > 0,05$ (Preglednica 15).

Preglednica 15: Dinamika razvoja zarodkov iz skupine OAT glede na razvoj do blastociste.

Stopnja (število celic)	Razvoj do blastociste				
	NE		DA		
	Povprečen čas [h]	SD	Povprečen čas [h]	SD	p vrednost
2C	3,4474	2,68515	2,4815	0,29397	0,296
3C	14,6775	6,88004	14,2083	1,16752	0,851
4C	19,3450	17,01394	15,0370	1,70330	0,460
5C	26,1479	6,01668	25,5000	4,90889	0,786
6C	28,9039	4,71986	27,0185	4,86801	0,347
8C	36,0389	12,64054	33,6296	5,55389	0,601
MO	63,1833	8,72098	61,4056	13,69329	0,867
BL			77,4093	5,30318	
2C – 4C	16,51	16,720	12,56	1,555	0,489
4C – 6C	14,28	4,234	11,98	4,132	0,198
5C – 8C	10,49	12,222	8,13	4,772	0,592

Izmed 31 zarodkov po TESE so se v razvoju do petega dne ustavili trije zarodki, izmed 38 zarodkov OAT pa se je razvoj ustavil pri petih zarodkih. S time-lapse mikroskopom je bil spremljan le en zarodek z zaustavitvijo razvoja iz skupine TESE in en zarodek iz skupine OAT. Zarodek TESE, pri katerem se je razvoj ustavil je od singamije do prve celične delitve potreboval več kot sedem ur. Premik iz štiriceličnega do šestceličnega zarodka je trajal manj kot eno uro, nato se je razvoj ustavil. Nasprotno pa je razvoj pri OAT zarodku do tri-celične stopnje potekal z normalno dinamiko. Od singamije do štiricelične stopnje pa je potreboval skoraj 84 ur.

4.5 DINAMIKA RAZVOJA ZARODKOV IN IMPLANTACIJA

Med zarodki, ki smo jih prenesli v maternico in so bili implantirani nismo ugotovili statistično značilnih razlik v dinamiki razvoja med obema skupinama. Zanimivo je, da so zarodki iz skupine TESE, ki so se ugnezdili v maternico bili v razvoju od singamije do faze dveh celic hitrejši v primerjavi s skupino OAT. Od singamije do stopnje osmih celic pa so potrebovali dobrih šest ur več (Preglednica 16).

Preglednica 16: Dinamika razvoja zarodkov vstavljenih v maternico in s katerimi je prišlo do zanositve.

Skupina	t 2C [h]	t 3C [h]	t 4C [h]	t 5C [h]	t 6C [h]	t 8C [h]	t MO[h]	t BL [h]
OAT Povprečje	4,5952	14,0306	17,3643	25,2067	28,2067	31,5667	56,3333	73,3500
N	7	6	7	5	5	3	1	1
SD	3,89665	6,00815	9,95783	3,80381	2,27293	0,95263	.	.
TESE Povprečje	2,4762	14,3810	15,1905	26,7619	29,9524	37,7778	61,2278	75,7833
N	7	7	7	7	7	6	3	3
SD	0,17817	1,26825	1,53788	6,96742	3,63842	6,32690	9,34494	3,65935
p vrednost	0,176	0,882	0,579	0,663	0,368	0,146	0,695	0,623

Tudi DNK spermijev skrajnih OAT pacientov lahko vsebuje nepravilnosti, kot so rahlo pakiranje kromatina in verižni zlomi DNK (Miller in Smith, 2001), vendar naj bi bile pri moških z neobstruktivno azospermijo kromosomske nepravilnosti večje. Pri spermijih iz testisov naj bi bilo genetsko vtisnjenje (angl. *Imprinting*) ob času oploditve še nedokončano (Knez, 2009). Ravno genetsko vtisnjenje pa igra pomembno vlogo pri regulaciji razvoja zarodka, ugnezditvi in pri nevrovedenjskih procesih. Naših hipotez, da se v postopku zunajtelesne oploditve zarodki po oploditvi s spermiji iz testisa drugače razvijajo kot zarodki po oploditvi s spermiji iz ejakulata, ne moremo potrditi. Pri dinamiki razvoja zarodkov, ugotovljenimi s time-lapse mikroskopijo, po oploditvi s spermiji iz testisa, se sicer kažejo nekatere razlike v primerjavi s spermiji pacientov z OAT. Rezultati kažejo na nekoliko počasnejši razvoj zarodkov iz skupine TESE do posamezne stopnje razvoja. Zelo opazen je počasnejši razvoj teh zarodkov od singamije do faze dveh celic. Prav tako smo opazili počasnejši razvoj zarodkov TESE od 4 do 6 celic, ob času, kjer pride do aktivacije genoma zarodka in se očetov vpliv na razvoj najbolj kaže, vendar se razlike med skupinama niso izkazale za statistično pomembne. Razlike med povprečji so premajhne, da bi jih lahko, glede na dano velikost vzorca, smiselno označili za razliko in vsebinsko interpretirati

Vzorec zarodkov, ki smo jih spremljali, in še posebej vzorec zarodkov, ki so bili uporabljeni pri analizi dinamike razvoja, je bil zelo majhen. Na podlagi dobljenih rezultatov bi bilo smiselno študijo nadaljevati na večjem številu zarodkov, kjer bi se zaenkrat zabrisane razlike med skupinama morda pokazale za statistično značilne.

5 SKLEP

Glede na to da so spermiji, pridobljeni iz testisov (TESE), manj zreli v primerjavi s spermiji iz ejakulata pacientov OAT, smo predvidevali, da bo ta faktor vplival na dinamiko razvoja zarodkov. Nezreli spermiji imajo namreč lahko nepravilne nukleoproteinske vzorce in porušeno integriteto molekul DNK. Seveda lahko tudi DNK spermijev skrajnih OAT pacientov vsebuje nepravilnosti kot so rahlo pakiranje kromatina in verižne zlome DNK, vendar naj bi bile pri moških z neobstruktivno azoospermijo kromosomske nepravilnosti pogostejše. Pri spermijih iz testisov naj bi bilo genetsko vtisnjenje ob času oploditve še nedokončano. Reprogramiranje, ki se pojavi po transkripcijskem mirovanju, vključuje kromosome, prevzete od spermijev, ki so visoko kondenzirani in metilirani ter organizirani okrog protaminov. Ravno v tem obdobju razvoja se je v naši študiji v večini primerov pokazala sprememba v dinamiki razvoja zarodkov iz skupine TESE, vendar so bile razlike majhne in niso bile statistično značilne. TESE zarodki so se na stopnji med štirimi in šestimi celicami začeli razvijati nekoliko počasneje. Stopnja štirih celic pa je tudi obdobje, ko zarodek iz transkripcijskega mirovanja prične z aktivacijo lastnega genoma. Ravno čas po aktivaciji genoma zarodka, po pojavu prvih lastnih transkripcijskih produktov, pa naj bi bil čas, ko se očetov vpliv na razvoj zarodka najbolj kaže. Glede na to bi lahko kljub temu, da med skupinama ni bilo statistično značilne razlike, sklepali, da se razvoj med skupinama vendarle nekoliko razlikuje. Ravno razlike, ki se kažejo na stopnji razvoja zarodka med štirimi in šestimi celicami, so izredno zanimive in nakazujejo na vpliv izvora spermijev na dinamiko razvoja zarodkov, zato bi bilo smiselno študijo izvesti oziroma nadaljevati na večjem vzorcu zarodkov, saj bi se morda statistično značilne razlike vendarle pokazale. Smotno bi bilo primerjati dinamiko OAT in TESE zarodkov vse do razvojne stopnje blastociste, saj smo opazili slabši razvoj zarodkov TESE do te razvojne stopnje. Ni pa izključeno, da spermiji iz testisa med procesiranjem v laboratoriju, ki vključuje inkubiranje v CO₂-inkubatorju, dozorijo in postanejo primerljivi spermijem iz ejakulata.

6 POVZETEK

Pri 30-55% neplodnih parov v reproduktivnem obdobju je vzrok težav neplodnost pri moškem. Zdravljenje moške neplodnosti je lahko uspešno samo z zunajtelesno oploditvijo, natančneje z neposrednim vnosom spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI), pri čemer v vsako jajčno celico partnerice s pomočjo mikroskopa in mikromanipulacijskega sistema vbrizgamo po en spermij. Med novejšimi in obetajočimi metodami ugotavljanja kakovosti zarodkov v programu zunajtelesne oploditve je spremljanje dinamike njihovega razvoja v časovnih presledkih, to je z uporabo time-lapse mikroskopije. Zanimal nas je vpliv izvora spermijev (spermiji iz ejakulata ali kirurško pridobljeni spermiji iz testisa) na zgodnji razvoj zarodka. Opazovali smo dinamiko razvoja zarodkov dveh skupin, in sicer tistih, ki so nastali z oploditvijo jajčnih celic s spermiji pacientov z oligoastenoteratozoospermijo (OAT) in drugih, ki so nastali z oploditvijo s spermiji iz testisa pacientov z neobstruktivno azoospermijo (TESE) z metodo ICSI. Razvoj zarodkov smo spremljali pod mikroskopskim sistemom time-lapse in z uporabo Primo Vision programske opreme analizirali razvoj posameznega zarodka. Določali smo čas singamije in pojav stadija dvoceličnega, triceličnega, štiriceličnega, šestceličnega in osemceličnega zarodka ter pojav morule in/ali blastociste. Vzporedno je bila ocenjevana kakovost oziroma morfologija zarodka na tretji in peti dan. Ključen, klinično uporaben parameter kakovosti zarodka v zgodnjih razvojnih stopnjah je morfologija, število in oblika celic ter fragmentacija. Bolj fragmentirani zarodki se običajno slabše razvijajo do razvojne stopnje blastociste in imajo manjšo možnost ugnezditve v maternici. Zarodek dobre kakovosti mora imeti manj kot 10 % fragmentov, celice pa morajo biti približno enake oblike in velikosti. Glede na to, da spermiji, pridobljeni iz testisov, še niso popolnoma zreli, smo pričakovali, da se bodo zarodki, ki so nastali z oploditvijo jajčnih celic s temi spermiji, razvijali počasneje oziroma da bodo v dinamiki razvoja med obema skupinama zarodkov opazne razlike. Razlike med obema skupinama so sicer bile opažene, vendar niso bile statistično značilne. Razvoj zarodkov TESE je večinoma potekal nekoliko počasneje v primerjavi z zarodki OAT. Razlike se kažejo predvsem na stopnji štirih do šestih celic, ko pride do aktivacije zarodkovega genoma in kjer bi pričakovali, da bo viden očetov vpliv na razvoj zarodka. Med obema skupinama ni bilo statistično značilne povezave. Raziskavo bi bilo smiselno nadaljevati na večjem vzorcu spremljanih zarodkov, ko bi se morda pokazale statistično značilne razlike. Kljub vsemu je potrebno poudariti, da so bili klinični rezultati z obema skupinama zarodkov dobri, kar kaže na to, da nakazane razlike niso bile na noben način kritične za zarodek.

7 VIRI

- Ayhan Ö., Balkan M., Guven A., Hazan R., Atar M., Tok A., Tolun A. 2014. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *Journal of Medical Genetics*, 51, 4: 239–244
- Balaban B., Urman B., Isiklar A., Alatas C., Mercan R., Aksoy S., Nuhoglu A. 2001. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. *Human Reproduction*, 16, 1: 125–129
- Čížek-Sajko M., Vlasisavljević V. 2002. Značilnosti razmnoževanja kumulusnih celic dominantnega folikla v *in vitro* pogojih. *Zdravniški vestnik*, 71: 25–29
- Foresta C., Ferlin A., Moro E. 2000. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Human Molecular Genetics*, 9, 8: 1161–1169
- Gardner D.K., Lane M., Stevens J., Schlenker T., Schoolcraft W. B. 2000. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 73, 6: 1155–1158
- Gilbert S. F. 2014. *Developmental biology*. 10th ed. Sunderland, Sinauer Associates: 894 str.
- Grove B.D., Vogl A.W. 1989. Sertoli cell ectoplasmic specializations: a type of actin-associated adhesion junction? *Journal of Cell Science*, 93: 309-323
- Hickman C. F. L., Lennon J., Cook C., Perez M. J., Mania A., Lavery S. 2013. Factors affecting morphokinetics: sperm origin, maternal age and ploidy. *Fertility and Sterility*, 100, 3: S6–S7
- Johnsen S.G. 1970. Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormones*, 1: 2–25
- Kloos B. 2011. *Andrology: Sperm Morphology*. *Fertility Centers of New England*. <http://www.fertilitycenter.com/fertility_cares_blog/andrology-blog-part-iv-sperm-morphology/> (31. maj 2016)
- Knez K. 2009. Vpliv morfologije spermijev na izid postopka neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI) v programu zunajtelesne oploditve. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Študij biotehnologije: 77 str.
- Knez K., Tomazevic T., Vrtacnik-Bokal E., Virant-Klun I. 2013. Developmental dynamics of IMSI-derived embryos: a time-lapse prospective study. *Reproductive BioMedicine Online*, 27, 2: 161–171

- Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S., Lombard C.J., Van der Merwe J.P., van Zyl J.A., Smith K. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46, 6: 1118-1123
- Lammers J., Reignier A., Spingart C., Catteau A., David L., Barriere P., Freour T. 2015. Does sperm origin affect embryo morphokinetic parameters? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32, 9: 1325–1332
- Latham K. E., Schultz R. M. 2001. Embryonic genome activation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 6: D748-759
- Menkveld R., Holleboom C. A., Rhemrev J. P. 2011. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian Journal of Andrology*, 13, 1: 59–68
- Miller E.J., Smith T.T. 2001. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Human Reproduction*, 16: 918-924
- O'Donnell L., Nicholls P. K., O'Bryan M. K., McLachlan R. I., Stanton P. G. 2011. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1, 1: 14–35
- Pera R. A. R. 2011. Non-invasive imaging of human embryos to predict developmental competence. *Placenta*, 32, 3: 264–267
- Pribenszky C., Losonczy E., Molnár M., Lang Z., Mátyás S., Rajczy K., Molnár K., Kovács P., Nagy P., Conceicao J., Vajta G. 2010. Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reproductive BioMedicine Online*, 20, 3: 371–379
- Purves W. K., Orians G. H., Sadava D., Heller H. C. 2003. *Life: The Science of Biology*. 7th ed. Sunderland, Sinauer Associates: 1121 str.
- Quintana-Murci L., Fellous M. 2001. The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland.” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1, 1: 18–24
- Ramaswamy S., Weinbauer G. F. 2014. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH / testosterone. *Spermatogenesis*, 4, 2: e996025, doi:10.1080/21565562.2014.996025: 15 str.
- Ramathal C., Angulo B., Sukhwani M., Cui J., Durruthy-Durruthy J., Fang F., Schanes P., Turek P. J., Orwig K. E., Reijo Pera R. 2015. DDX3Y gene rescue of a Y chromosome AZFa deletion restores germ cell formation and transcriptional programs. *Scientific Reports*, 5: 15041, doi: 10.1038/srep15041: 13 str.
- Sato A., Otsu E., Negishi H., Utsunomiya T., Arima T. 2006. Aberrant DNK methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Human Reproduction*, 22, 1: 26–35
- Shoukir Y., Chardonens D., Campana A., Sakkas D. 1998. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Human Reproduction*, 13, 6: 1632–1637

- Silber S. J., Disteche C. M. 1993. Y Chromosome Infertility. GeneReviews® [internet]. Seattle, University of Washington.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1339/>> (6. junij 2016)
- Studart D. 2016. Embryonic gene activation - Developmental Biology | Fastbleep.
<<http://www.fastbleep.com/biology-notes/32/159/865>> (20. maj 2016)
- Tanaka A., Nagayoshi M., Takemoto Y., Tanaka I., Kusunoki H., Watanabe S., Kuroda K., Takeda S., Ito M., Yanagimachi R. 2015. Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 47: 14629–14634
- Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomaževič T. 2002. Od nastanka gamet do rojstva: oploditev z biomedicinsko pomočjo. Radovljica, Didakta: 255 str.
- Virant-Klun I. 2004. Ta čudoviti zarodek: atlas spolnih celic in zarodkov pri zunajtelesni oploditvi. Ljubljana, samozaložba: 135 str.
- Vitrolife. Primo Vision Culture Dish.
<http://www.vitrolife.com/sv/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/Primo-Vision-Embryo-Culture-Dish/> (25. julij 2016)
- Wong C. C., Loewke K. E., Bossert N. L., Behr B., De Jonge C. J., Baer T. M., Pera R. A. R. 2010. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology*, 28, 10: 1115–1121
- Wong C., Chen A. A., Behr B., Shen S. 2013. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reproductive BioMedicine Online*, 26, 2: 120–129
- World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva, World Health Organization: 271 str.
- Zhou X., Wang Y., Yun Y., Xia Z., Lu H., Luo J., Liang Y. 2016. A potential tool for diagnosis of male infertility: Plasma metabolomics based on GC–MS. *Talanta*, 147: 82–89

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorici prof. dr. Irmi Virant – Klun za priložnost opravljanja magistrskega dela pod njenim mentorstvom, za vse napotke in pomoč ter spodbudo pri pisanju magistrskega dela. Hvala za vaš čas, ki ste si ga vzeli zame! Poleg tega gre zahvala tudi dr. Martinu Stimpflu in dr. Ivanu Verdeniku iz Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Zahvala tudi recenzentki prof. Lilijani Bizjak Mali za strokovni pregled magistrskega dela.

Na koncu se seveda zahvaljujem še staršem, bratu Mihi in stricu Bibiju. Hvala vsem prijateljem (še posebej Janu) in študijskim kolegom Nacetu, Črtu, Maticu in Katji, ki so mi stali ob strani v času študija in tekom pisanja magistrskega dela.

D: _____

L: _____

Priimek: _____

piktati	oocite	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan
		1				
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						