

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra NUSSDORFER

**VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA V  
TEHNOLOGIJI OPLODITVE Z BIOMEDICINSKO  
POMOČJO**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra NUSSDORFER

**VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA V TEHNOLOGIJI  
OPLODITVE Z BIOMEDICINSKO POMOČJO**

MAGISTRSKO DELO

**SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS IN ASSISTED  
REPRODUCTION TECHNOLOGY**

MASTER OF SCIENCE THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 28. 9. 2015, je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja biologije.

Magistrsko delo je nastalo v okviru magistrskega podiplomskega študija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Inštitutu za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Kazimir Drašlar in za somentorico izr. prof. dr. Aleksandra Milutinović Živin.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Ruda ZORC-PLESKOVIČ  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo

Član: izr. prof. Branko ZORN  
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika

Datum zagovora: 8.9 2016

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

Petra NUSSDORFER

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md

DK UDK 616.699(043.2)=163.6

KG VEM/ metoda priprave vzorcev/ semenčice/

AV NUSSDORFER, Petra, univ. dipl. biologinja

SA DRAŠLAR, Kazimir (mentor)/MILUTINOVIĆ ŽIVIN, Aleksandra (somentor)

KZ SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biologije

LI 2016

IN VRŠTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA V TEHNOLOGIJI OPLODITVE  
Z BIOMEDICINSKO POMOČJO

TD Magistrsko delo

OP X, 87 str., 49 sl., 60 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Slaba kakovost semena je eden od vzrokov moške neplodnosti. Rutinska temeljna analiza semena pokaže večino značilnosti vzorca, vendar bi bila v določenih razmerah primerna tudi uporaba vrščične elektronske mikroskopije (VEM). VEM z elektronsko ločljivostjo omogoča detajlni pogled v morfologijo semenčice. Predpostavljamo, da tako pridobljeni rezultati dajo pomembno dodatno informacijo in pomoč zdravniku. Namen naloge je bil izbrati in prilagoditi metodo ter izdelati protokole uporabne v klinični praksi za pripravo vzorcev semenčic moških vključenih v postopek zdravljenja neplodnosti za pregled z VEM. Med obravnavanimi protokoli prilagojeni postopek fiksacije z aldehydним fiksativom s postfiksacijo z osmijem, omogoča najboljše rezultate. Dehidracijo in sušenje celic tako pri kritični točki kot tudi s hexamethyldisilazanom (HMDS) smo najprej opravili na krovnih stekelcih. Preizkusili smo tudi postopek z dehidracijo v centrifugiranih. Dehidrirane vzorce smo nanесли na krovna stekelca in jih posušil s HMDS. Pri tem so bile izgube celic manjše, poškodbe pri sušenju pa večje kot pri sušenju pri kritični točki. Zato smo v nadaljnji fazi postopek priprave preparatov nadgradili s procesiranjem celic na membranskem filtru. Dehidracija in sušenje s HMDS je potekala v filtrirnem lončku, kontinuirano, brez vmesnega centrifugiranja in redispergiranja vzorca. S tem smo se izognili izgubam in poškodbam vzorca. Za pregledovanje morfoloških značilnosti semenčic je priprava na krovnih stekelcih in sušenje pri kritični točki optimalen postopek. Vzorci pri katerih je razpoložljivi volumen majhen oziroma je koncentracija semenčic nizka, zahtevajo večjo previdnost. V takih primerih je optimalna priprava preparatov na membranskem filtru. Razvili in preizkusili smo protokole priprave semenčic za VEM, ki zagotavljajo ustrezno sliko oblike semenčic.



## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md

DC UDC 616.699(043.2)=163.6

CX SEM/method for sample preparation/spermatozoa/

AU NUSSDORFER, Petra

AA DRAŠLAR, Kazimir (supervisor)/MILUTINOVIĆ ŽIVIN, Aleksandra (co-supervisor)

PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biology

PY 2016

TI SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS IN ASSISTED REPRODUCTION TECHNOLOGY

DT M.Sc. Thesis

NO X, 87 p., 49 fig., 60 ref.

LA sl

AL sl/en

**AB** Poor quality of semen is one of the causes of male infertility. The routine basic semen sample analysis method shows most of the semen characteristics but in certain critical cases, it is not good enough to detect the cause of male infertility. The use of scanning electron microscope (SEM) examination could give a detailed view of spermatozoon morphology. The purpose of the thesis was to select, adjust and optimize a method and then establish the protocol required for use in clinical practice to prepare spermatozoa samples for scanning electron microscope (SEM) examination that would give results with high level of reliability. Among the protocols we tested, the adapted procedure of fixation with aldehyde fixative and osmium postfixation enabled the best fixation, reliability, repetability and comparability of results. The dehydration and drying of cells, both at critical point as well as with hexamethyldisilazane (HMDS), were first performed on coverglass. However, there were uncontrollable losses of the material due to its not sticking to the surface and frequently being washed. We were unable to determine why in some cases the cells did and in other did not stick to the surface. Next, we tested the process of dehydration in centrifuge tubes. We applied HMDS to the dehydrated samples, placed those samples on coverglass and air-dried them. Such process caused fewer losses of cells but the damage due to air-drying was worse than with the critical point drying method. To lessen that damage, we processed the cells on membrane filter instead of coverglass. Dehydration and HMDS drying took place in a gooch crucible, continuously, without any centrifugation or redispersion of the sample. Through such process we avoided losses and damage to the sample. In general, the best method to investigate morphological features of spermatozoa is preparation on coverglass and critical point drying method. When samples are small in size or spermatozoa concentration is low, they require greater care. In such cases the optimal method to use is the membrane filter preparation. We have developed and tested the protocols for preparation of spermatozoa for SEM process that ensure a proper image of a spermatozoon appearance.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b> .....	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b> .....	<b>IV</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>X</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>4</b>
2.1 ZGRADBA IN KVALITETA SEMENSKE TEKOČINE.....	4
2.2 ZGRADBA SEMENČICE .....	4
2.3 SPERMATOGENEZA .....	7
2.4 OCENA KAKOVOSTI SEMENA .....	11
<b>2.4.1 Temeljna analiza semena - spermiogram</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.2 Nadstandardno testiranje semena</b> .....	<b>15</b>
2.5 PRIPRAVA PREPARATA ZA PREGLED Z VEM.....	19
<b>2.5.1 Priprava vzorca</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5.2 Izdelava preparata</b> .....	<b>20</b>
2.5.2.1 Fiksacija.....	20
2.5.2.2 Dehidracija.....	22
2.5.2.3 Sušenje.....	23
2.5.2.4 Namestitev vzorca .....	24
2.5.2.5 Namestitev in napraševanje preparatov .....	24
<b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>26</b>
3.1 MATERIAL.....	26
<b>3.1.1 Biološki material</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.2 Kemikalije</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.3 Oprema</b> .....	<b>27</b>
3.2 METODE.....	28
<b>3.2.1 Priprava vzorca</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.2 Izdelava preparata na krovnem stekelcu</b> .....	<b>28</b>
3.2.2.1 Fiksacija.....	28
3.2.2.2 Lepljenje celic na krovna stekelca .....	29

3.2.2.3	Dehidracija.....	30
<b>3.2.3</b>	<b>Dehidracija v centrifugirkah in sušenje semenčic s HMDS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Priprava preparatov na membranskem filtru .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Priprava preparatov iz nefiksiranega tkiva mod podgane .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Priprava preparatov iz parafinskih vzorcev .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>38</b>
4.1	FIKSACIJA VZORCEV ZA VEM.....	38
<b>4.1.1</b>	<b>Fiksacija z aldehydним fiksativom in postfiksacija z osmijem.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Fiksacija z osmijem.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Fiksacija z aldehydi .....</b>	<b>41</b>
4.2	LEPLJENJE SEMENČIC NA KROVNA STEKELCA .....	42
<b>4.2.1</b>	<b>Premaz krovnih stekelc z Alcian modrim .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Premaz krovnih stekelc s Poly-L-Lysinom.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Premaz krovnih stekelc z Bind-Silanom.....</b>	<b>45</b>
4.3	SUŠENJE VZORCEV ZA VEM .....	46
<b>4.3.1</b>	<b>Sušenje pri kritični točki.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Sušenje s HMDS.....</b>	<b>47</b>
4.4	DEHIDRACIJA V CENTRIFUGIRKAH IN SUŠENJE SEMENČIC S HMDS . .....	48
4.5	PRIPRAVA PREPARATOV ZA VEM NA MEMBRANSKEM FILTRU .....	48
4.6	ČISTOST VZORCA IN PREPARATOV .....	49
4.7	PRIPRAVA PREPARATOV NEFIKSIRANEGA TKIVA MODA PODGANE .....	52
4.8	PRIPRAVA PREPARATOV IZ PARAFINSKIH REZIN .....	54
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>55</b>
5.1	RAZPRAVA.....	55
5.2	SKLEPI.....	58
5.3	NADALJNE DELO .....	58
<b>5.3.1</b>	<b>Druge celice in bakterije v vzorcu.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Napake glave semenčice .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Morfološke napake vratu .....</b>	<b>67</b>
<b>5.3.4.</b>	<b>Morfološke napake repa.....</b>	<b>72</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Semenčice z odvečno rezidualno citoplazmo .....</b>	<b>74</b>
<b>5.3.6</b>	<b>Druge morfološke nepravilnosti semenčic.....</b>	<b>75</b>
5.4	UPORABNOST VEM V KLINIČNI PRAKSI.....	75
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	<b>78</b>

6.1	POVZETEK.....	78
6.2	SUMMARY.....	79
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>80</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba semenčice. ....	5
<b>Slika 2:</b> Shematski prikaz zgradbe človeške semenčice. ....	6
<b>Slika 3:</b> Spermatogeneza ali nastanek semenčic. ....	8
<b>Slika 4:</b> Spermioogeneza ali diferenciacija moških gamet .....	10
<b>Slika 5:</b> Morfološko normalna oblika semenčice.....	12
<b>Slika 6:</b> Morfološko nenormalne oblike semenčic z napakami v glavi .....	13
<b>Slika 7:</b> Morfološko nenormalne oblike semenčic z napakami vratu in glavnem dela repa. .....	14
<b>Slika 8:</b> Morfološko nenormalne oblike semenčic z odvečno rezidualno citoplazmo.....	14
<b>Slika 9:</b> Morfološko nenormalne oblike semenčic z napakami v glavnem delu repa. ....	15
<b>Slika 10:</b> Svetlobna in VEM mikrografija. ....	17
<b>Slika 11:</b> Prikaz oblike in površinskih struktur semenčice v širokem razponu povečav in ločljivosti.....	17
<b>Slika 12:</b> Preparati pripravljeni za mikroskopiranje z VEM na kovinskem nosilcu. ....	25
<b>Slika 13:</b> Shema poteka priprave preparata s tremi različnimi fiksacijami, lepljenje na krovna stekelca, dehidracijo, sušenjem s CPD ali HMDS. ....	32
<b>Slika 14:</b> Shema poteka priprave preparata v centrifugirkah. ....	34
<b>Slika 15:</b> Improvizirani sistem za filtracijo (Millipore Filter Holder) .....	35
<b>Slika 16:</b> Shema poteka priprave preparata na membranskem filtru. ....	36
<b>Slika 17:</b> Značilne mikrografije semenčic fiksiranih po dvostopenjskem protokolu z aldehidi in osmijem. ....	39
<b>Slika 18:</b> Značilne mikrografije semenčic fiksiranih samo z osmijem. ....	40
<b>Slika 19:</b> Značilne mikrografije semenčic fiksiranih z aldehidnim fiksativom. ....	41
<b>Slika 20:</b> Značilne mikrografije semenčic prilepljenih na krovnike z Alcian modrim.....	43
<b>Slika 21:</b> Značilne mikrografije semenčic prilepljenih na krovnike s Poly-L-Lysinom. ....	44
<b>Slika 22:</b> Značilne mikrografije semenčic prilepljenih na krovnike z Bind-Silanom.....	45
<b>Slika 23:</b> Značilne mikrografije semenčic posušenih v postopku CPD .....	47
<b>Slika 24:</b> Značilne mikrografije semenčic posušenih s HMDS .....	47
<b>Slika 25:</b> Značilne mikrografije semenčic na membranskem filtru. ....	49
<b>Slika 26:</b> Mikrografije semenčic brez nečistoč. ....	50

<b>Slika 27:</b> Mikrografije onesnaženj na preparatu..	51
<b>Slika 28:</b> Mikrografije tkiva moda podgane.....	53
<b>Slika 29:</b> Mikrografije tkiva moda podgane pripravljenih iz parafinskih rezin.....	54
<b>Slika 30:</b> Mikrografije drugih celic v preparatu.....	59
<b>Slika 31:</b> Mikrografije bakterij na preparatu.....	60
<b>Slika 32:</b> Mikrografije semenčic s podolgovato glavo.....	61
<b>Slika 33:</b> Mikrografije semenčic s hruškasto obliko glave .....	62
<b>Slika 34:</b> Mikrografija semenčice z majhno površino akrosoma.....	62
<b>Slika 35:</b> Mikrografije semenčice z okroglimi glavami in glavami brez akrosoma .....	63
<b>Slika 36:</b> Mikrografije semenčice amorfnih oblik.....	64
<b>Slika 37:</b> Mikrografije semenčice z deformacijami na površini glave.....	65
<b>Slika 38:</b> Mikrografija semenčice z asimetrično vstavljenim vratom.....	67
<b>Slika 39:</b> Mikrografije semenčic z upognjenimi vratovi.....	68
<b>Slika 40:</b> Mikrografije semenčic z odebeljenim stikom.....	69
<b>Slika 41:</b> Mikrografije semenčic s stanjšanim stikom.....	71
<b>Slika 42:</b> Mikrografije semenčic z nenormalnimi vratovi.....	71
<b>Slika 43:</b> Mikrografija semenčice s kratkim repom.....	72
<b>Slika 44:</b> Mikrografije semenčic z upognjenim ali zvitim repom.....	73
<b>Slika 45:</b> Mikrografije semenčic z odvečno rezidualno citoplazmo.....	74
<b>Slika 46:</b> Mikrografiji dvoglavih semenčic.....	75
<b>Slika 47:</b> Mikrografiji semenčic ovrednotenih z VEM. Stanjšani vratovi, odsotnost mitohondrijev .....	76
<b>Slika 48:</b> Mikrografiji semenčic ovrednotenih z VEM. Citoplazmatski ostanki, deformirani vratovi in repi .....	76
<b>Slika 49:</b> Mikrografiji semenčic ovrednotenih z VEM. Razkritje miofibril, citoplazmatski ostanki .....	77

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CPD	ang. critical point drying / slov. sušenje pri kritični točki
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EM	elektronska mikroskopija
FD	ang. freeze drying / slov. zamrznjeno sušenje
HMDS	hexamethyldisilazane
ICSI	angl. intracytoplasmic sperm injection / slov. neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice
IMSI	angl. intracytoplasmic morphologically selected sperm injection / slov. metoda neposrednega vnosa, izbrane semenčice po natančnejšem mikroskopskem pregledu, v citoplazmo jajčne celice
IUI	intrauterina inseminacija
IVF	oploditev <i>in vitro</i> ; zunajtelesna oploditev
ROS	ang. reactive oxygen species / slov. reaktivne kisikove spojine
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
VEM	vrstična elektronska mikroskopija
WHO / SZO	ang. World Health Organization / slov. Svetovna zdravstvena organizacija

## 1 UVOD

Neplodnost postaja resna težava sodobne družbe. Sodoben način življenja ter hiter življenjski slog botrujeta manjši skrbi za zdravje ter kasnejšemu odločanju za družino, s tem pa se tudi vzroki neplodnosti mnogokrat skrijejo in težave prepoznavajo prepozno. Neplodnost je bolezen, opredeljena kot nezmožnost doseči uspešno zanositev po 12 mesecih ali več nezaščitenih spolnih odnosov (WHO, 2010). Po statističnih podatkih je neplodnih 10 do 14 odstotkov parov; pri 50 do 60 odstotkov neplodnih parov je vzrok za neplodnost pri moškem (pri 30 odstotkih parov samo pri moškem, pri 20 do 30 odstotkih parov pri moškem in ženski) (Zorn, 2014).

Če se omejimo na vzroke neplodnosti na moški strani potem so zanimive ugotovitve zadnjih 40 let, ki kažejo, da se kvaliteta semena slabša. Moška neplodnost je lahko pridobljena ali prirojena. Prirojeno neplodnost povzročijo genetske nepravilnosti zarodka in vplivi okolja v času razvoja spolnih žlez. Po rojstvu pridobljena neplodnost je lahko posledica bolezni, škodljivih vplivov okolja, strupov itd.. Pogosto so prirojeni in pridobljeni vzroki prepleteni in jih zato težko opredelimo (Virant - Klun in sod., 2002). Pojasnjeni so le redki mehanizmi neplodnosti (npr. pomanjkanje gonadotropinov), ostale patologije so še predmet raziskovanj (Zorn, 2014). V nasprotju z žensko neplodnostjo vzroki za moško neplodnost pogosteje ostanejo nepojasneni (Nilsson in Hamberger, 2007). Dejavniki tveganja za razvoj neplodnosti pri moškem so lahko slabo spuščeno modo, varikokele, okužbe (spolno prenosljive bolezni), vnetje moda, nadmodka, sečnice, endokrina obolenja, operacije, onkološko zdravljenje, neplodnost v družinski anamnezi, genetski dejavniki itd. Genetski dejavniki prispevajo 15 do 30 odstotkov k etiologiji moške neplodnosti. (Peterlin in Hodžić, 2014). Neplodnost pri moškem je lahko povezana s funkcijo semenčic, okvaro zorenja in sproščanja semenčic v izvodila, motenj v ejakulaciji ali psihogenimi vzroki neplodnosti (Vlaisavljević in Knez, 2014). Zelo pogosto je vzrok za neplodnost prav v življenjskem stilu in vplivih okolja. Moderen in posledično manj zdrav način življenja ima velik vpliv na kvaliteto semenčic. Na plodnost tako vplivajo: temperatura (tesna oblačila, redno sedenje itd.), kemikalije (pesticidi, herbicidi itd.), zdravila, prisotnost estrogena v prehrani, sevanje, alkohol, kajenje, debelost, stres, itd..



Medicina rešuje probleme moške neplodnosti z zdravili, kirurškimi posegi in s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo (Virant – Klun in sod.,2002). Mednje štejemo umetno osemenitev (intrauterino inseminacijo - IUI) in zunajtelesno oploditev s prenosom zarodka. Pri umetni osemenitvi - inseminaciji, se seme vnese v maternično votlino, tako več semenčic doseže jajčno celico kar poveča možnost oploditve in zanositev (Reljič, 2014). Postopek je primeren za zdravljenje parov z zmerno poslabšano kakovostjo semena (Fekonja, 2014 ).

Pri zunajtelesni oploditvi poteka oploditev »*in vitro*«, zunaj telesa. Znana je metoda ICSI (angl. intracytoplasmic sperm injection), pri kateri se semenčico vnese neposredno v citoplazmo jajčne celice. Postopek se uporabi, kadar je semenčic v semenskem izlivu malo, so slabo gibljive in imajo očitne strukturne napake. V ekstremnih primerih, ko v izlivu ni prisotnih semenčic, lahko semenčice pridobimo iz nadmodka ali moda s punkcijo ali kirurškimi posegi (Vlaisavljevič in Knez, 2014). Mogoča je oploditev jajčne celice tudi z nezrelimi, zarodnimi celicami - spermatidami (Virant - Klun in sod., 2002).

Nadgradnja metode ICSI je metoda neposrednega vnosa izbrane semenčice po natančnejšem mikroskopskem pregledu semenčice, v citoplazmo jajčne celice - IMSI (angl. intracytoplasmic morphologically selected sperm injection). Z metodo ICSI in IMSI se je razširil tudi kirurški pristop in možnosti zdravljenja moške neplodnosti. Spoznanje, da lahko semenčice pridobljene iz mod ali nadmodka, oplodijo jajčne celice, je eno najpomembnejših odkritji na področju oploditve z biomedicinsko pomočjo. Semenčice pridobijo z aspiracijo ali biopsijo mod ali nadmodka (Virant - Klun in sod., 2002).

Prvi postopek pri zdravljenju neplodnosti je ocena kakovosti semena oziroma spermogram. Laboratorijsko oceno kakovosti semena delimo na temeljno (osnovno) in nadstandardno testiranje (Zorn, 2014). Pri temeljni analizi se oceni viskoznost, barvo, pH in volumen semenskega izliva ter koncentracijo, število, gibljivost, vitalnost in morfologijo (obliko) semenčic (Knez, 2009; Virant - Klun in sod., 2002). Včasih preiskav ne moremo omejiti le na temeljno analizo semena, ker nam ne nudi dovolj natančne morfologije. Zato moramo vključiti v temeljno analizo še nadstandardno testiranje. K nadstandardnemu testiranju prištevamo elektronsko mikroskopijo, ki vključuje transmisijsko (TEM) in

vrstično elektronsko mikroskopijo (VEM) (Zorn, 2014). VEM nam omogoča vstop v svet velikih povečav in nanometrskih ločljivosti. VEM omogoča morfološko preučevanje površin. Slike imajo veliko globinsko ostrino in ločljivost, ki omogoča tridimenzionalno predstavo (Watson in sod., 1980). Pri pripravi vzorca za VEM moramo upoštevati lastnosti vzorca in uporabiti specifične metode priprave. Osnovne zahteve pri pripravi so: vzorec mora biti obstojen v vakuumu in snopu elektronov, zadostna emisija sekundarnih elektronov ( $e_2$ ), odsotnost motečih nabijanj in čistost preiskovane površine (Pollak, 2003; Lutar 2009). Da zadostimo vsem zahtevam je pomembna izbira tehnike priprave preparata glede na vzorec.

## 1.1 NAMEN DELA

Glavni namen magistrskega dela je bil izbrati in optimizirati metodo, s katero bo mogoče hitro, enostavno, zanesljivo in ponovljivo pripraviti preparate semenčic za vrstično elektronsko mikroskopijo, ki bo uporabna in obenem koristna v klinični praksi.

### **Glavni cilji naloge so bili:**

- Izbrati optimalno metodo za pripravo vzorca za VEM,
- izbrati in preveriti ustrezen način fiksacije semenčic,
- izbrati in preveriti postopke sušenja preparatov in
- izdelati protokol priprave preparatov, ki bo uporaben v medicinski diagnostiki.

### **Delovne hipoteze:**

- dvostopenjska fiksacija z aldehidi in osmijem zagotavlja najboljše rezultate,
- sušenje pri kritični točki daje najboljše rezultate,
- lepljenje semenčic na krovna stekelca je ustrezen postopek in
- VEM je ustrezen in uporaben postopek za prikaz oblike semenčic.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGRADBA IN KVALITETA SEMENSKE TEKOČINE

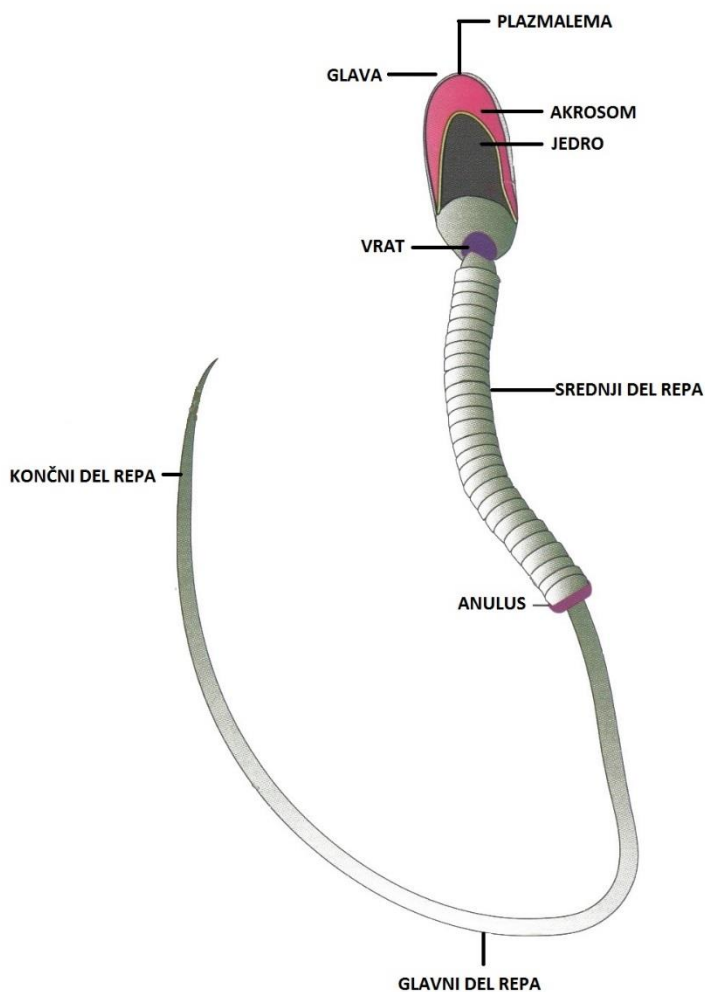
Seme je tekočina, ki se izloči iz spolnega uda pri ejakulaciji. V njem so zrele semenčice, odluščen epitelij genitalnih vodov in semenska tekočina, ki nastaja v pomožnih spolnih žlezah. V ejakulatu je normalno 1,5 do 5 ml viskozne, rahlo alkalne semenske tekočine z okrog 150 do 500 milijonov semenčic (Vraspir-Porenta, 2005).

Po merilih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) mora biti v semenu normalne kakovosti več kot 30 odstotkov semenčic z normalno obliko. Da se semenčica oceni kot oploditveno sposobna, morajo biti tako glava, vrat in rep normalni.

### 2.2 ZGRADBA SEMENČICE

Zrela semenčica sestoji iz glave, vratu in repa, ki se deli na srednji, glavni in končni del (Slika 1).

Obliko semenčic se ocenjuje po merilih SZO ali po Krugerjevih merilih. Semenčica mora biti brez nepravilnosti glave, vratu in repa. Če je kateri od teh parametrov na meji, se semenčica smatra kot nenormalna (Kruger in sod., 1993).



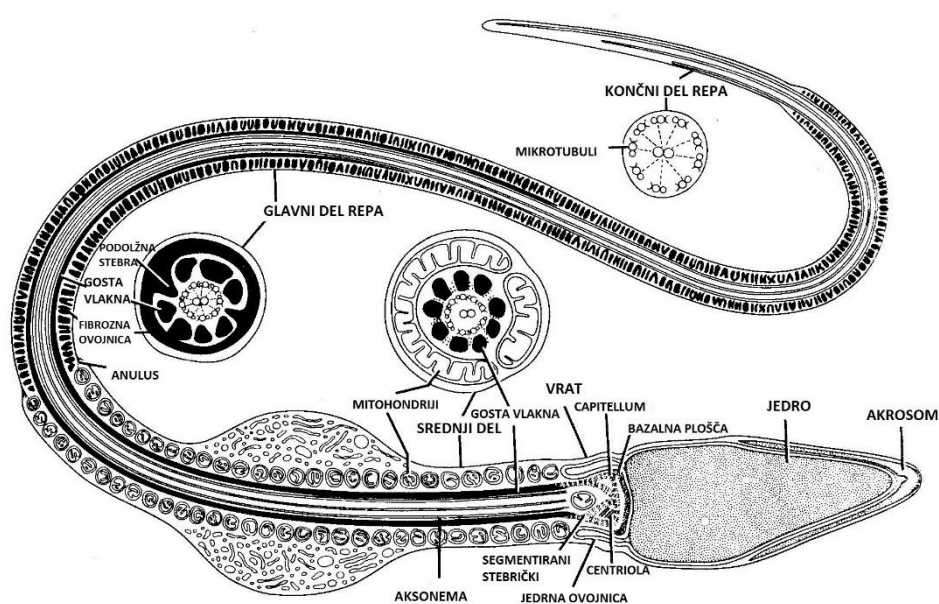
**Slika 1:** Zgradba semenčice (prirejeno po Kierszenbaum, Tres, 2012).

Glava semenčice je običajno sploščena ali elipsoidna (Slika 2). Po Krugerjevih merilih naj bi bila dolžina glave normalne semenčice 4 do 5  $\mu\text{m}$  in širina 2,5 do 3  $\mu\text{m}$ . Prekriva jo plazmalema. Pretežni del prostora zavzema modificirano jedro (Lentz, 1971). Jedro vsebuje zgoščen heterokromatin in posamezne vakuole z razpršenim kromatinom (Vraspir-Porenta, 2005).

Vrat povezuje glavo in srednji del repa semenčice. V vratu se nahajata proksimalni in distalni centriol, preostanek jedrne ovojnice, preostanek citoplazme, proti glavi semenčice

pa sega bazalna plošča, ki je sklepna struktura med glavo in vratom (Bavdek, 1986; Fekonja, 2014).

Največji del vratu zapolnjuje devet segmentiranih stebričkov, ki obdajajo centriol in se distalno združijo z gostimi vlakni. Eden od striatnih stolpičev se proti glavi semenčice razširi in tvori capitellum, ki se zrašča z bazalno ploščo (Slika 2).



**Slika 2:** Shematski prikaz zgradbe človeške semenčice (prirejeno po Kessel in Kardon, 1982).

Srednji del repa semenčice je dolg približno 6 do 10  $\mu\text{m}$  in debel 1  $\mu\text{m}$ . Skozi ves rep semenčice poteka aksonema, ki je skupaj z devetimi zunanjimi gostimi vlakni strukturna osnova za gibljivost semenčice. Vzdolžno potekajoča zunanja gosta vlakna obdajajo spiralno zviti mitohondriji, ki se končajo na prehodu srednjega dela repa v glavni del repa. Tu plazmalema tvori fibrozni prstan, anulus. Anulus preprečuje zdrs mitohondrijev iz srednjega dela v glavni del repa (Vraspir-Porenta, 2005). Citoplazemska razširitev, ki se nahaja vzdolž polovice srednjega dela predstavlja rezidualno citoplazmo (Slika 2).

Glavni del repa je najdaljši odsek semenčice, meri približno 45  $\mu\text{m}$  in ima premer 0.5  $\mu\text{m}$  (Kruger in sod., 1986). V centralnem delu je aksonemski kompleks. Mitohondrijev ni več.

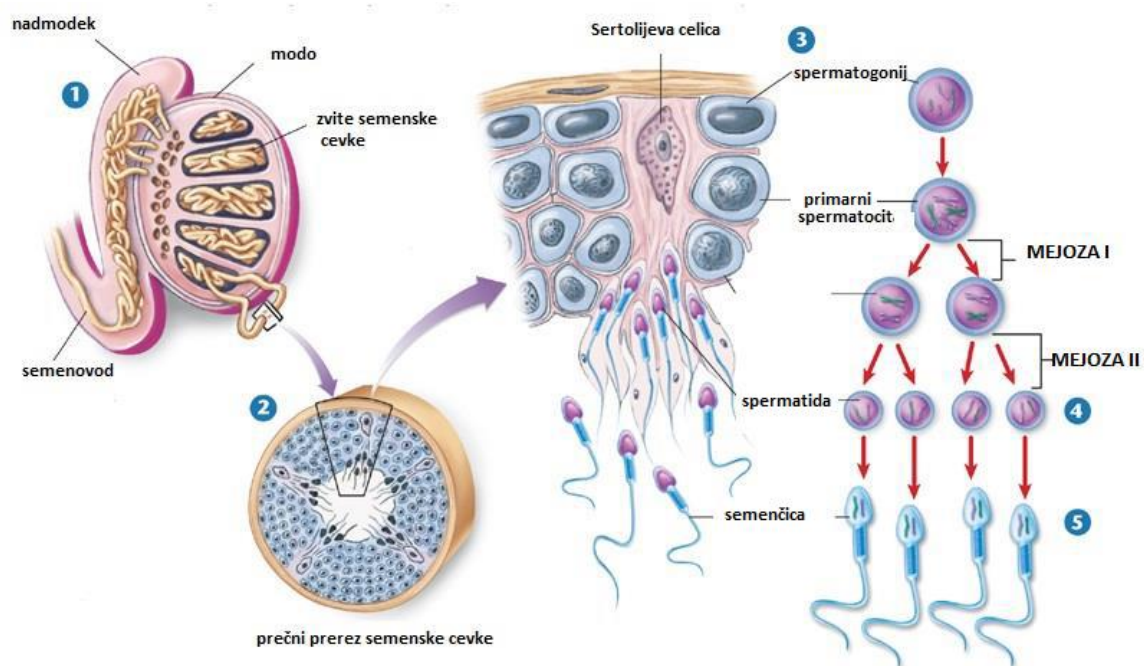
Gosta vzdolžna vlakna, ki se nadaljujejo iz srednjega dela repa, so obdana s številnimi rebrasto razporejenimi vlakni. Tretje in osmo vzdolžno gosto vlakno v tem delu repa izgineta, ker se združita z rebrasto razporejenimi vlakni. Na mestu združitve nastane sprednji in zadnji vzdolžni steber. Stebra razdelita glavni del repa v dva morfološko in funkcionalno različna odseka. V enem so tri gosta vzdolžna vlakna, v drugem štiri. Na ta način nastala asimetrija repa naj bi bila vzrok za valujoče gibanje semenčice (Vraspir-Porenta, 2005).

Konec repa je dolg od 5 do 7  $\mu\text{m}$  in ima premer manjši od 1  $\mu\text{m}$  (Virant - Klun in sod., 2002). Sestavlja ga samo aksonemski kompleks obdan s celično membrano (Slika 2) (Vraspir-Porenta, 2005).

### 2.3 SPERMATOGENEZA

Semenčice nastajajo v procesu spermatogeneze. Spermatogeneza je kontinuiran proces, ki poteka v semenskem epiteliju zvitih semenskih cevk v modu. Semenski epitelij sestavljajo zarodne in Sertolijeve celice, ki segajo skozi vso višino semenskega epitelija. V semenskem epiteliju imajo Sertolijeve celice obrambno, oporno in prehranjevalno funkcijo. V ugreznitvah plazmaleme Sertolijevih celic pa ležijo zarodne celice v različnem razvoju spermatogeneze (Vraspir-Porenta, 2005).

Spermatogeneza se začne s spolno zrelostjo in traja do pozne starosti. Proces diferenciacije semenčic začneja vsak dan približno 1.5 milijona spermatogonijev kar pomeni, da v reproduktivnem obdobju moškega nastaja približno 30 milijonov semenčic na dan. Proces od spermatogonija do zrele semenčice traja 64 do 70 dni (Virant - Klun in sod., 2002, Vraspir-Porenta, 2005).



**Slika 3:** Spermatogeneza ali nastanek semenčic (prirejeno po spletnem viru: [superagatoide.altervista.org](http://superagatoide.altervista.org)).

Spermatogeneza poteka v več fazah: ločimo spermatocitogenezo, mejozo in spermogenezo. Med spermatocitogenezo ali spermatogonijsko fazo, se spermatogoniji mitotsko delijo. Iz njih nastajajo enake celice - spermatogoniji ali pa iz njih nastajajo primarni spermatociti. V fazi mejoze (spermatocitna faza) se primarni spermatociti v procesu prve mejotske delitve delijo v sekundarne spermatocite, ti pa v procesu druge mejotske delitve v spermatide. Med spermogenezo (spermatidna faza) pa se spermatide preoblikujejo v zrele semenčice (Slika 3) (Vraspir Porenta, 2005; Pawlina, 2016).

#### Mitotska delitev spermatogonijev

Spermatogoniji so zarodne celice semenskega epitelija. Glede na izgled celičnega jedra ločimo tri tipe spermatogonijev. Temni spermatogoniji tipa A imajo ovalno jedro z gostim kromatinom. So rezervne zarodne celice. Z mitotsko delitvijo iz njih nastane par temnih spermatogonijev tipa A ali par svetlih spermatogonijev tipa A, ki imajo svetlo ovalno jedro. Po več zaporednih mitotskih delitvah iz svetlih spermatogonijev tipa A nastanejo

spermatogoniji tipa B, ki imajo okroglo jedro. Z mitotsko delitvijo spermatogonijev tipa B nastane primarni spermatocit, ki kmalu po nastanku vstopi v prvo mejotsko delitev. Primarni spermatociti so največje celice v semenskem epiteliju, ki se oddaljijo od bazalne lamine in se pomaknejo proti notranjosti cevk (Vraspir-Porenta, 2005; Pawlina, 2016).

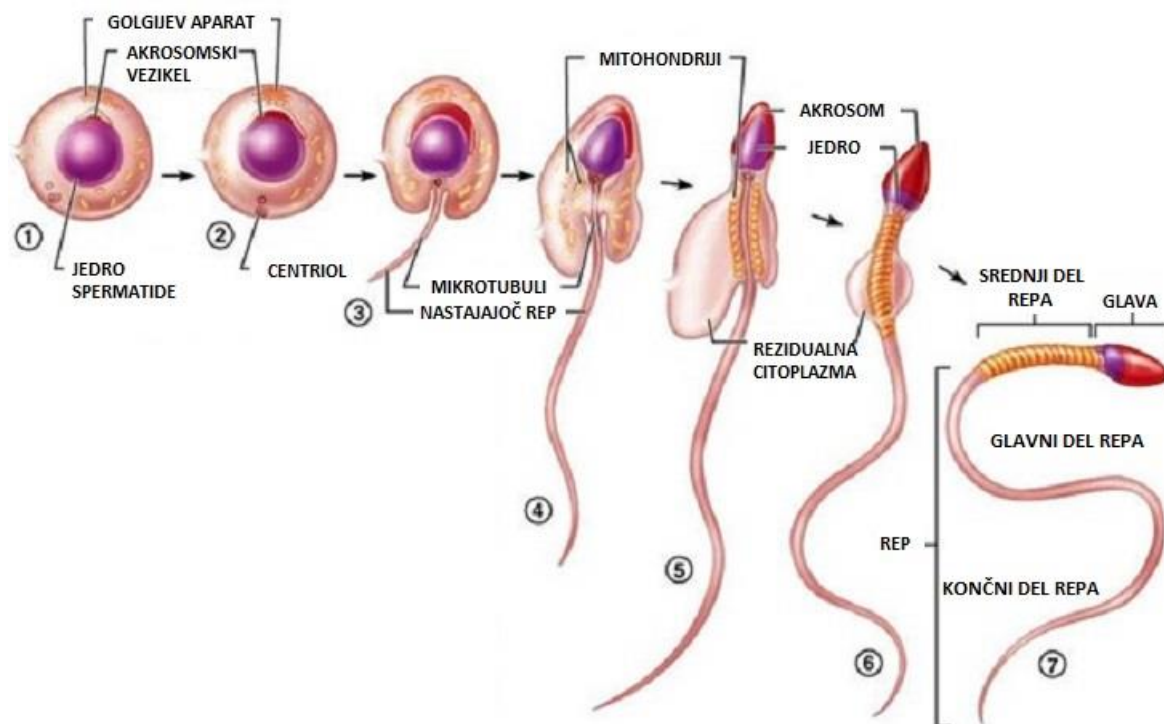
#### Mejotska delitev spermatocitov

Mejotska delitev spermatocitov poteka v dveh fazah - kot mejoza I in mejoza II. Mejoza I se prične v primarnih spermatocitih. Po podaljšan profazi prve mejotske delitve nastane dva sekundarna spermatocita, ki imata haploidno število kromosomov. Po končani drugi mejotski delitvi, iz sekundarnih spermatocitov nastanejo haploidne, okrogle spermatide (Vraspir-Porenta, 2005; Pregl Breznik, 2013).

#### Spermiogeneza

Spermiogeneza je proces pretvorbe okroglih spermatid v semenčice (Slika 4). Spermatogeneza poteka v štirih fazah: Golgijeva faza, faza akrosomske kape, akrosomska faza in faza zorenja. V Golgijevi fazi v Golgijevem kompleksu nastane z membrano obdan akrosomski mešiček z encimi, potrebnimi za oploditev. Centriola potujeta na nasprotno stran od akrosomskega mešička in sprožita nastanek dveh centralnih in devet perifernih mikrotubulov, ki tvorijo aksonemo. V fazi akrosomske kape akrosomski mešiček pridobi polmesečno obliko in se namesti nad sprednjo polovico jedra kot akrosom (Vraspir-Porenta, 2005; Živin, 2014). V akrosomski fazi del celice z akrosomom predstavlja sprednji pol celice, ki je ugreznjen v plazmalemo Sertolijevih celic, nastajajoči rep pa moli v svetlino cevk. V tej fazi se mitohondriji kopičijo od vratu do konca srednjega dela semenčice. V fazi zorenja spermatide odvržejo ostanke citoplazme, ki jo fagocitirajo Sertolijeve celice. Semenčice se sprostijo iz semenskega epitelija v svetlino semenskih cevk (Vraspir-Porenta, 2005; Živin, 2014).





**Slika 4:** Spermogeneza ali diferenciacija moških gamet (prirejeno po spletnem viru: majordifferences.com).

V modu so semenčice zaradi nezrelosti večinoma negibljive ali pa je njihova gibljivost prostorsko omejena. Ko se sproščajo iz moda, potujejo skozi nadmodek, kjer se skladiščijo, pri čemer nadalje zorijo in postanejo gibljive (Kierszenbaum in sod., 2012). Dozorevanje semenčic vključuje strukturne in funkcionalne spremembe, ki vodijo do postopnega pridobivanja oploditvene sposobnosti (Virant - Klun in sod., 2002).

Nepravilnosti v spermatogenezi vodijo v nastanek semena slabše kakovosti, ki je pogosto povezana z moško neplodnostjo. Lahko gre za majhno število semenčic (oligozoospermijo), slabo gibljivost semenčic (astenozoospermijo) ali z znižano količino semenčic z normalno morfologijo (teratozoospermijo) (Kierszenbaum in sod., 2012).

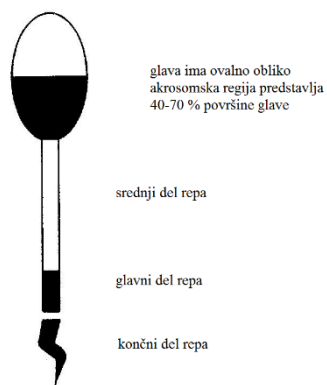
## 2.4 OCENA KAKOVOSTI SEMENA

Ocena kvalitete semena nakazuje oploditveno sposobnost semenčice. Pri oceni se upošteva: koncentracija, gibljivost in oblika semenčic (Knez, 2009). Laboratorijsko oceno kakovosti semena delimo v temeljno (osnovno) in nadstandardno testiranje (Zorn, 2014).

### 2.4.1 Temeljna analiza semena - spermogram

Spermogram je standardizirana preiskava, ki jo določa in priporoča Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, 2010). Zajema makroskopski in mikroskopski pregled ter analizo semenske tekočine. Makroskopski pregled vključuje meritev volumna in pH ter oceno barve, utekočinjenje in viskoznost semenske tekočine. Z mikroskopsko analizo ugotavljamo koncentracijo semenčic, prisotnost levkocitov in drugih celic, ocenimo njihovo gibljivost, obliko in vitalnost. Pri tej analizi lahko določimo protitelesa proti semenčicam, ki so lahko vzrok za neplodnost, prisotnost parazitov, gliv in bakterij.

Pri oceni oblike semenčice se ocenjujejo nepravilnosti glave, nepravilnosti vratu, nepravilnosti repa, ostanki citoplazme in pojav nezrelih razvojnih oblik semenčic v semenskem izlivu. V uporabi je več metod ocenjevanja oblike semenčic (Zorn, 2014). V Androloškem laboratoriju Ginekološke klinike v Ljubljani se uporablja ocena, ki sloni na Krugerjevih merilih. Po teh merilih mora biti v semenu plodnega moškega vsaj 14 odstotkov semenčic z normalno obliko (Slika 5), stanje pod 14 odstotki normalnih semenčic je povezano s slabšo oploditveno sposobnostjo, 0 do 3 odstotkov normalnih semenčic pa kaže na resne morfološke nepravilnosti in verjetno nezmožnost oploditve.



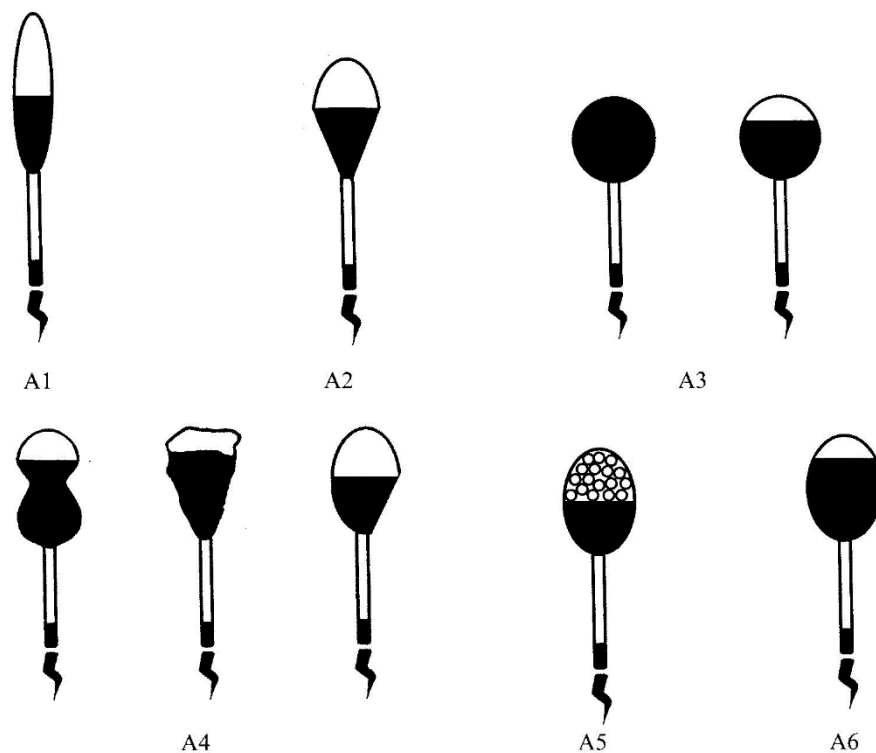
**Slika 5:** Morfološko normalna oblika semenčice (Zorn, 2014).

Normalna oblika semenčice napoveduje zmožnost zanositve v naravnih in umetnih razmerah (Tüttelmann in Nieschlag, 2010). Ob hudi teratozoospermiji sta tako lahko neuspešni tudi klasična oploditev *in vitro* in metoda neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice (Zorn, 2014). V teh primerih bi prišla v poštev dodatna preiskava semena z VEM, ki nam nudi pogled v morfologijo/obliko semenčice. Preiskave za moško neplodnost ne smemo omejiti le na analizo semena, pomembna je tudi klinična obravnava (Zorn, 2014).

Za prepoznavanje in klasifikacijo strukturnih in oblikovnih lastnosti semenčic se uporablja svetlobna in elektronska mikroskopija (Sathananthan, 1996).

Med nepravilnostmi glave (Slika 6) se pojavljajo nepravilnosti akrosoma, ki je najverjetneje najbolj pogost vzrok zmanjšane plodnosti moškega, kot na primer delna odsotnost, popolna odsotnost, vključki, degeneracija in nerazvitost akrosoma, majhen akrosom - manj kot 40 odstotkov prostornine glave ali velik akrosom - več kot 70 odstotkov prostornine glave, vakuoliziran in majhen akrosom, strukturne nepravilnosti kot so hruškasta glava, amorfnost glava, zelo stanjšana glava na mestu, kjer je pritrjen rep, zelo stanjšana glava po vsej dolžini (podolgovata glava), stanjšana glava po sredini, okrogla glava - globozoospermija (to je popolna odsotnost akrosoma, ki vodi v spremembo oblike jedra in se kaže kot sferična glava semenčice), vakuolizirana glava (prisotnost več kot 2 vakuoli), nepravilne dimenzije glave kot so premajhna ali prevelika glava - vsebuje

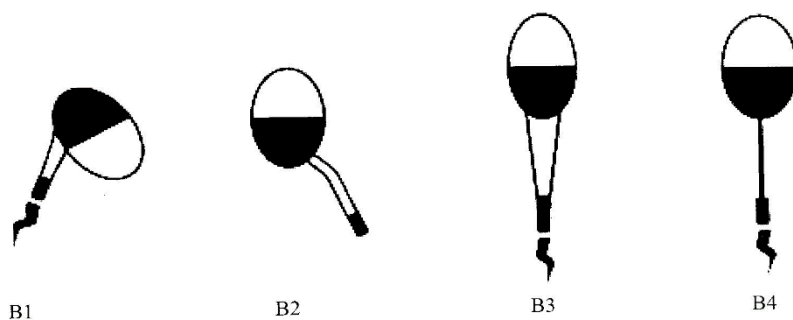
diploidni genetski material v jedru, dvojna glava, odsotnost glave in nepravilnosti površine glave (Virant - Klun in sod., 2002).



**Slika 6:** Najbolj pogoste morfološko nenormalne oblike semenčic z napakami, ki nastanejo v glavi.: podolgovata glava (A1), glava hruškaste oblike (A2), okrogla glava brez akrosoma ali z akrosomom z zmanjšano površino (A3), amorfne semenčice (A4), glava z vakuolami (A5), glava z majhno površino akrosoma (A6) (Zorn, 2014).

Te okvare strukture semenčice so povezane z nesposobnostjo prepoznavanja semenčice in jajčne celice ter vezavo in fuzijo s plazmalemo jajčne celice (Küpker in sod., 1998).

Med nepravilnosti vratu in srednjega dela repa (Slika 7) se prištevajo kriv rep (vrat in rep tvorita kot  $90^\circ$ ), nezrelost semenčice s citoplazemskim ostankom (obdaja bazalni del glave, srednji del ali glavni del repa) (Slika 8), nepravilni vezni del (brez mikrotubulov, centriola), asimetrična vsaditev srednjega dela repa v glavo, debel ali nepravilen srednji del repa, nenormalno tanek srednji del repa (ovojnica iz mitohondrijev deloma manjka ali ne vsebuje mitohondrijev), deformirano ali hipertofirano fibrozno ovojnico (Virant - Klun in sod., 2002).

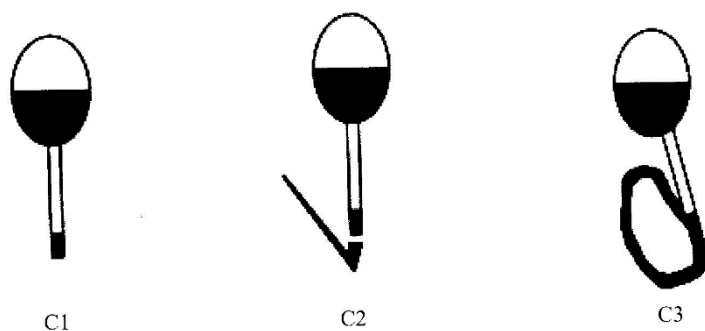


**Slika 7:** Najbolj pogoste morfološko nenormalne oblike semenčice z napakami, ki nastanejo v vratu in v srednjem delu repa: upognjen vrat (B1), asimetrično nastavljen vrat (B2), vrat z zadebeljenim stikom (B3), vrat s tankim stikom (B4) (Zorn, 2014).



**Slika 8:** Morfološko nenormalne, netipične oblike semenčic z odvečno rezidualno citoplazmo (Zorn, 2014).

Nepravilnosti glavnega dela repa (Slika 9) vključujejo nepravilno vsaditev repa (rep izrašča iz nepravilnega dela glave), različne dolžine repa, zvit rep okoli glave ali okoli celotne celice, rep pod kotom 90° glede na glavo, več repov, ki izraščajo iz iste glave, kratek rep in rep nepravilnih širin (Virant - Klun in sod.,2002; WHO, 2010).



**Slika 9:** Najbolj pogoste morfološko nenormalne oblike, netipične semenčice z napakami, ki nastanejo v glavnem delu repa: kratek glavni del repa (C1), upognjen glavni del repa (C2), zvit glavni del repa (C3) (Zorn, 2014).

Osnovna uporabljena metoda ocenjevanja oblike semenčic je metoda barvanja po Papanicolaou (Jesenovac in sod., 1990). V uporabi so še metode barvanja po Giemsi, Bryan-Leishmanu, Shorru in Diff Quick barvanje. Metode omogočajo primerljivost med posameznimi preparati in primerljivost med posameznimi laboratoriji. Preparati predstavljajo referenčni vzorec, na katerem lahko ocenimo strukturo in obliko (Virant-Klun in sod., 2002).

Svetlobna mikroskopija omogoča opazovanje in ocenjevanje živih semenčic. Z svetlobnim mikroskopom ocenimo mobilnost semenčic, ki je eden od pomembnih kriterijev oploditvene sposobnosti. Pri svetlobni mikroskopiji obstajajo fizikalne omejitve pri ločljivosti pri strukturnih raziskavah celic in tkiv (Goodhew in sod., 2000).

#### **2.4.2 Nadstandardno testiranje semena**

Nadstandardno testiranje delimo v izbirne in raziskovalne funkcionalne teste, ki so namenjeni v diagnostične in terapevtske namene.

Med izbirne teste uvrščamo biokemijsko analizo semena (pokaže funkcijo semenskih izvodil in pomožnih spolnih žlez), postkoitalni test (pokaže interakcijo med semenčicami in cervikalno sluzjo in določa koliko semenčic preživi v cervikalni sluzi) ter analizo gibljivosti semenčic s pomočjo računalnika (program spremlja in prikazuje značilnosti gibanja semenčic).

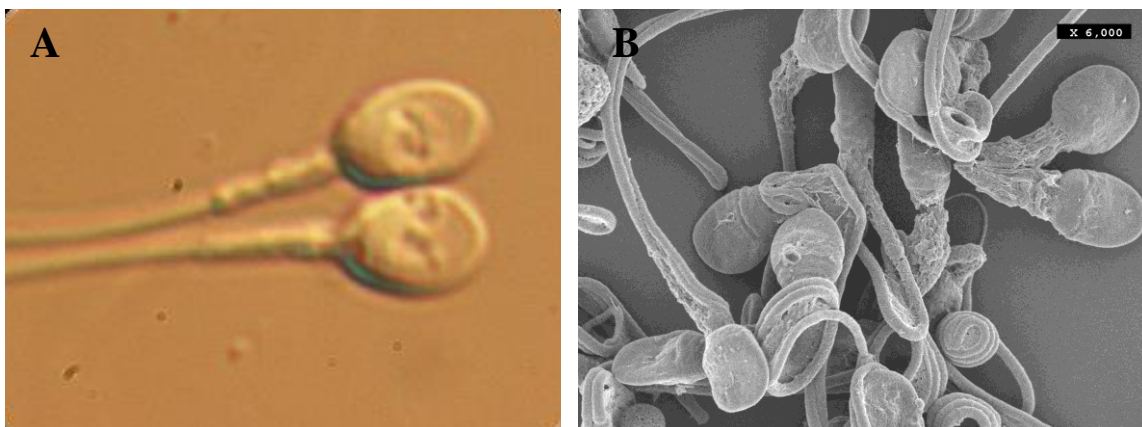
Raziskovalni funkcionalni testi vključujejo teste interakcij med semenčicami in jajčno celico, akrosomske reakcije, genetske raziskave semenčic, meritve integritete DNK semenčic, meritve kisikovih prostih radikalov in elektronsko mikroskopijo (Zorn, 2014). Semenčice slabe kakovosti (slabe gibljivosti ali slabših oblik) in polimorfonuklearni levkociti v semenu sproščajo aktivne derivate kisika (ROS). Ti povzročajo peroksidacijo

poli - nenasičenih maščobnih kislin v membrani semenčice in z oksidativnim stresom porušijo integriteto DNK semenčice, močno poškodujejo funkcionalne lastnosti semenčice ter s tem njihovo oploditveno sposobnost (Pasqualotto, 2001).

Elektronska mikroskopija omogoča boljšo ločljivost. Sodobni elektronski mikroskopi omogočajo nanometrsko ločljivosti in več tisočkratne povečave. Z elektronsko mikroskopijo preiskujemo fiksirana, mrtva tkiva in celice. Specifika elektronske mikroskopije tako TEM kot tudi VEM je, da preiskava poteka v vakuumu, kar je omejitev pri raziskavah živih, praviloma hidriranih vzorcih biološkega izvora. To zahteva posebno, relativno dolgotrajno pripravo vzorca in posebne preparativne metode. Pri postopkih priprave vzorca pa je treba računati tudi z nastankom artefaktov, nekontroliranih strukturnih in biokemičnih sprememb vzorca.

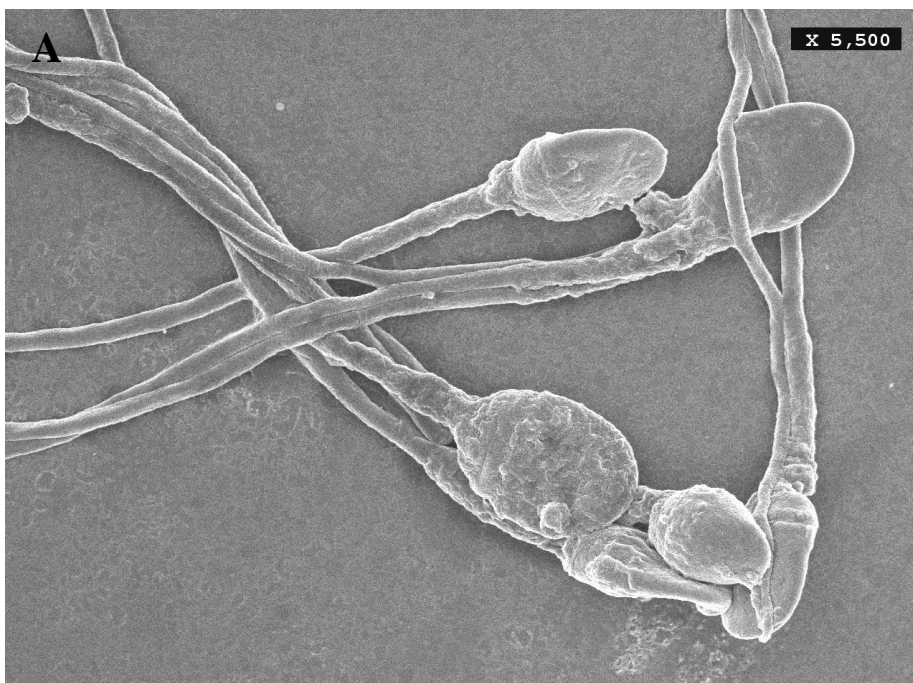
S transmisijsko elektronsko mikroskopijo se strukturne značilnosti preiskuje v rezini, ki razkriva notranjo organiziranost celice, z visoko ločljivostjo. Vendar pa slika prikaže majhen, praviloma naključen izsek celice. Z razvojem imunocitokemijskih metod na področju TEM je mogoče ugotavljanje položaja proteinov in določenih anorganskih celičnih komponent (Knez, 2009).

Vrstični elektronski mikroskop omogoča opazovanje površine vzorca z nanometrsko ločljivostjo v širokem razponu povečav (Goodhew in sod., 2000). VEM se relativno redko uporablja v klinični diagnostiki, čeprav omogoča poleg prikaza strukturnih detajlov tudi detekcijo molekulskih markerjev na površini. S protitelesi lahko dokazujemo odsotnost ali prisotnost specifičnih receptorjev, ki so zelo pomembni pri vezavi semenčice in jajčne celice. Metoda omogoča pregled in primerjavo velikega števila semenčic (500-1000 semenčic).



**Slika 10:** Primerjava slike svetlobne mikroskopije (A) (Fekonja, 2014) in VEM (B) semenčic pri isti povečavi. VEM omogoča natančnejši prikaz površine semenčic, kot ga vidimo pod svetlobnim mikroskopom.

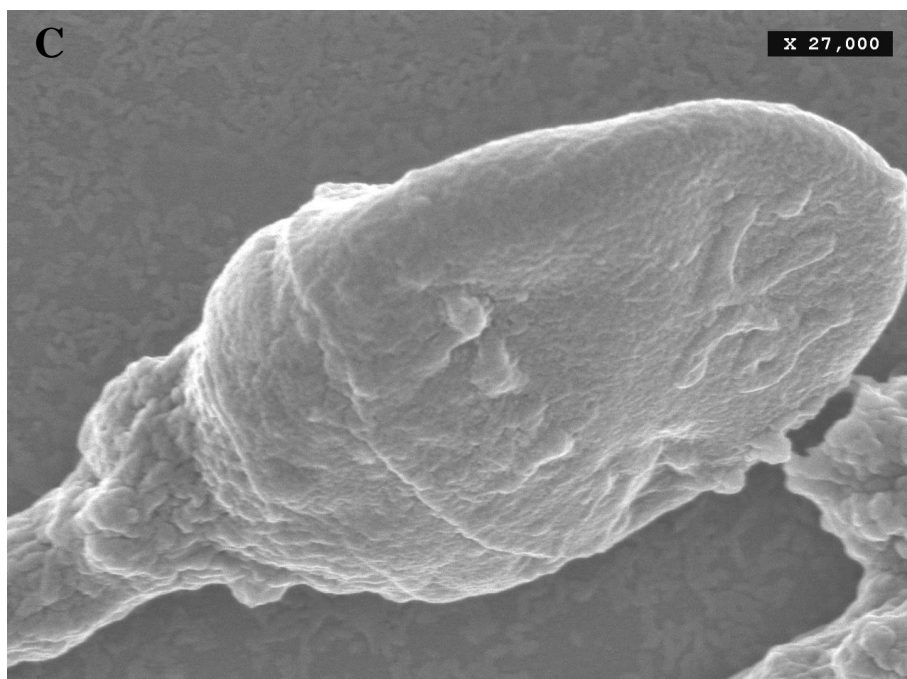
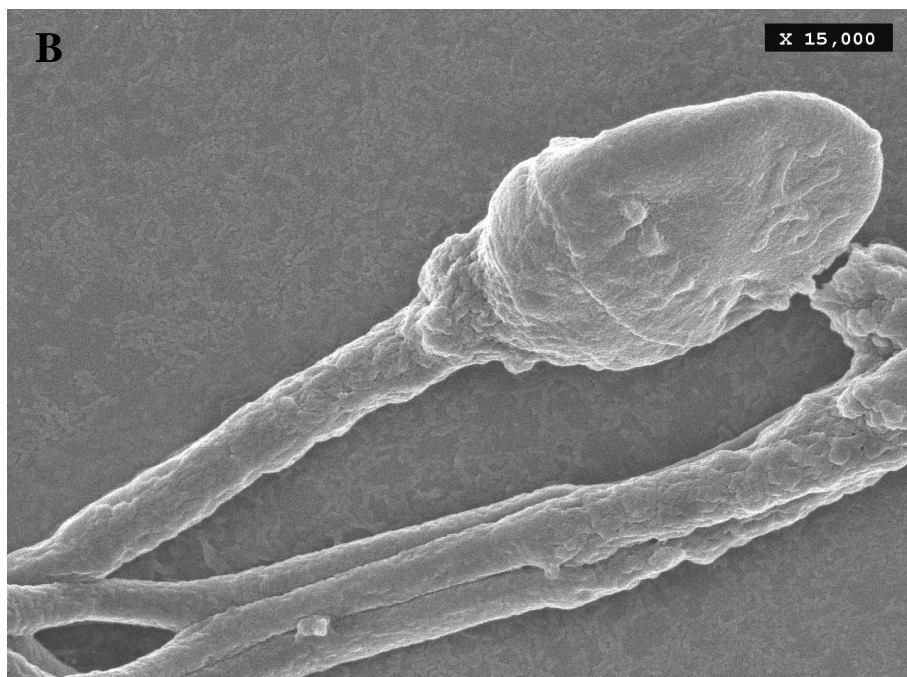
VEM bi lahko, zaradi večje ločljivosti, kot jo omogoča svetlobna mikroskopija (Slika 10), in širokega razpona povečav (Slika 11), postala uporabna dodatna preiskava pri diagnostiki težkih primerov moške neplodnosti.



**Slika 11:** Mikrografija pri 5.500 kratni povečavi (A). Slika se nadaljuje.

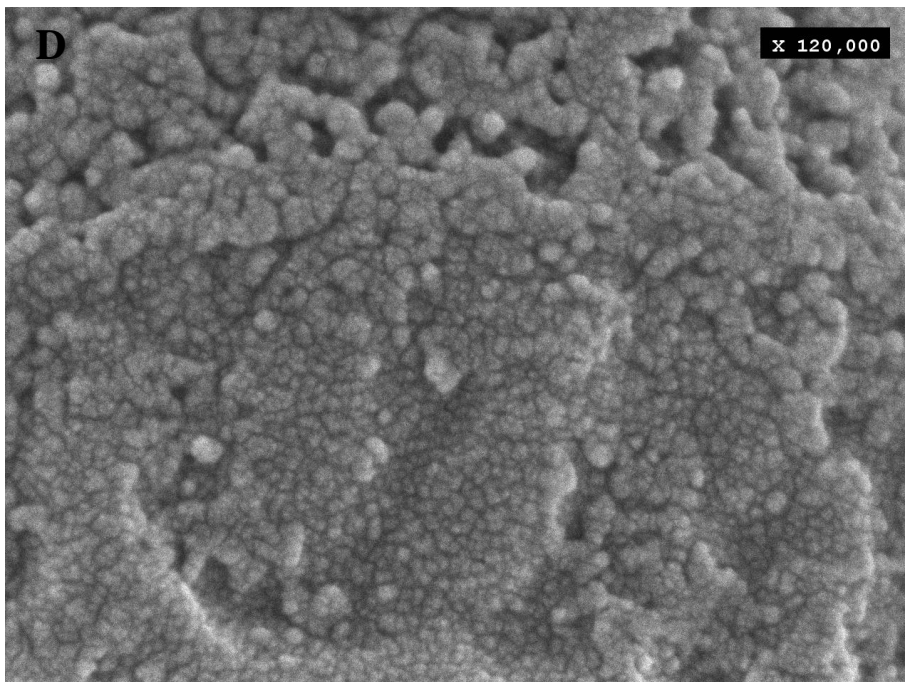


Nadaljevanje Slike 11.



**Slika 11:** Mikrografija pri 15.000 kratni (B) in 27.000 kratni povečavi (C). Slika se nadaljuje

Nadaljevanje Slike 11.



**Slika 11:** Prikaz oblike in površinskih struktur semenčice z vrstično elektronsko mikroskopijo v širokem možnem razponu povečav in ločljivosti (A-D), površina akrosoma pri 120.000 kratni povečavi (D).

## 2.5 PRIPRAVA PREPARATA ZA PREGLED Z VEM

VEM se uporablja v raziskavah, ki zahtevajo večjo povečavo in ločljivost, kot jo lahko zagotovi svetlobna mikroskopija. Pri pripravi preparata za VEM moramo upoštevati lastnosti vzorca in izpolniti specifične zahteve za mikroskopiranje z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Vzorec za VEM mora biti obstojen v vakuumu in elektronskem snopu. Površina mora biti čista, prevodna in mora generirati dovolj sekundarnih ( $e_2$ ) elektronov. Izpolnitev teh zahtev pogojuje specifično pripravo in obdelavo vzorca.

Osnovni postopki priprave vzorca in izdelave preparata za VEM so: postopek priprave samega vzorca, ki mu sledi postopek izdelava preparata in zajema fiksacijo, dehidracijo, sušenje, namestitev vzorca ter napraševanje.

### 2.5.1 Priprava vzorca

Prvi postopek pri pripravi preparata je zagotovitev čistosti površine in določitev velikosti vzorca. Običajno s spiranjem s primernimi pufri ali z izotonično raztopino pred fiksacijo odstranimo nečistoče, kot so semenska plazma, ostanke gojišča in sluz, ki bi morebiti zakrile pomembne strukture na površini. Pri tem je pomemben ustrezen pH in ozmolarnost raztopin ter kompatibilnost med vzorcem, pufri in fiksativom.

Najpogosteje se uporabljajo fosfatni in kakodilatni pufri. Fosfatni pufri so »fiziološki« pufri in niso preveč toksični za celice. Primerni so za uporabo s počasi prodirajočimi in/ali reagirajočimi fiksativi. Kakodilatni pufri so stabilni, enostavni za pripravo in kompatibilni z večino fiksativov. Vsebujejo arzen in so citotoksični, zaradi česar moramo z njimi ravnati previdno (Waterman, 1980; Maugel in sod., 1980; Watson in sod., 1980). Po naših izkušnjah dobimo najčistejšo površino vzorca pri uporabi Na-kakodilatnega pufra (Rode, 1991).

### 2.5.2 Izdelava preparata

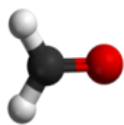
#### 2.5.2.1 Fiksacija

S fiksacijo ustavimo življenjske funkcije. Podobo objekta skušamo ohraniti tako, da struktura preiskovanega objekta čim manj odstopa od stanja *in vivo* - ohraniti poskušamo volumska razmerja, obliko in prostorsko razporeditev organelov in makromolekul. Pri pripravi hidriranega materiala za VEM sta v rabi kemijska in fizikalna fiksacija. Kemijska fiksacija stabilizira strukture z uporabo kemijskih agensov. Pri fizikalni fiksaciji se za stabilizacijo struktur največkrat uporablja zamrzovanje (Googhew in sod., 2000).

Pri fizikalni fiksaciji vzorce hitro zamrznemo. Pri počasnem zamrzovanju nastajajoči ledeni kristali praviloma poškodujejo celično strukturo. Hitrost zamrzovanja mora biti tako velika, da pride do vitrifikacije vode. Ta metoda je tako primerna za vzorce manjših dimenzij. Zamrzovanje lahko poteka pri različnih temperaturah in tlakih. (Boyde in Macconnachie, 1980).

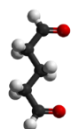
Pri kemijski fiksaciji je stopnja ohranitve površinske strukture odvisna od tega, kako fiksacijsko sredstvo reagira s celičnimi komponentami, preden se začno avtolitične spremembe. Avtolitične spremembe se začno ob celični smrti, zato je za pripravo preparata idealno, da fiksacija sama povzroči celično smrt. Fiksativ naj bi hitro prodiral v celico in omogočal mreženje proteinov v celici v ustreznih razmerah (Waterman, 1980; Nowell in Pawley, 1980). V pripravi preparatov za VEM se uporabljajo fiksativi v različnih kombinacijah in koncentracijah, puferskih sistemih, pH območjih in različnih časovnih okvirih. Uporablja se fiksacija v dveh stopnjah: fiksacija z aldehidi, ki ji sledi postfiksacija za utrjevanje struktur in kontrastiranje s težkimi kovinami in drugimi spojinami.

Organski aldehidi navzkrižno povezujejo amino skupine in s tem koagulirajo beljakovine ter stabilizirajo strukturo vzorca, kar zmanjša deformacije med pripravo preparata (Hearle in sod.,1974).



Formaldehid ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) je monoaldehid. Prednost formaldehida je hitro prodiranje. Reakcija je počasna in reverzibilna. Permeabilnost celičnih membran po tretiranju s formaldehidom ni popolnoma ustavljena. Zaradi ekstrakcije proteinov je pomembna izbira pufra (Watson in sod.,1980).

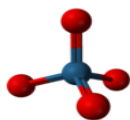
Formalin je vodna raztopina formaldehida. V uporabi je polimer paraformaldehid. Čist formalin, brez stabilizatorja, za potrebe v mikroskopiji, pripravljamo z depolimerizacijo paraformaldehida v alkalnem okolju. Komercialnemu formalinu je dodan metanol, kot stabilizator, ki preprečuje polimerizacijo in povzroča deformacije preparata (Kiernan, 1990; Leicabiosystems, 2016).



Glutaraldehid ( $\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ ) je dialdehid, ki stabilizira strukture z navzkrižno povezavo proteinov ter tako zmanjša možnost ekstrakcije. Slabo stabilizira lipide. V vodni raztopini polimerizira. Glutaraldehid se uporablja v kombinaciji s fosfatnim, Na-

kakodilatnim ali s-kolidinskim pufrom v časovnem okviru 1 do 24 ur (Watson in sod., 1980; Kiernan, 1990). Za fiksacijo biološkega materiala za elektronsko mikroskopijo (EM) se, zaradi njunih lastnosti uporablja kombinacija obeh fiksativov (glutaraldehida in formaldehida) z nosilnim pufrom, v območju pH med 7,2 in 7,4; formaldehid prodira hitro in slabše stabilizira, medtem, ko počasnejši glutaraldehyd strukture trajneje utrdi (Kiernan, 1990).

V pripravi preparatov za VEM poskušamo s postfiksacijo s težkimi kovinami in drugimi spojinami dodatno utrditi strukture celic in s tem dodatno povečati izplen sekundarnih elektronov ter tako zagotoviti boljšo prevodnost površine in termično obstojnost preparata (Watson in sod., 1980).



Osmijev tetroksid ( $\text{OsO}_4$ ) pri pripravi preparatov za elektronsko mikroskopijo stabilizira lipide in omogoči boljši signal ter električno prevodnost preparata. Brez uporabe osmija se lahko med dehidracijo ekstrahira do 95% lipidov. Problem fiksacije z osmijem je njegovo počasno prodiranje v celice, zaradi česar se lahko spremeni struktura, še preden se stabilizira, zato osmij uporabljamo bolj za postfiksacijsko tretiranje. Neprijetnost osmija je tudi njegova toksičnost in cena (Nowel in Pawley, 1980).

#### 2.5.2.2 Dehidracija

Dehidracija je postopek s katerim vodo v vzorcu odstranimo in zamenjamo z drugim medijem. Biološki materiali vsebujejo veliko vode, zato je dehidracija za večino bioloških materialov nujna. Za vrščino elektronsko mikroskopijo mora biti objekt suh. Ko voda v vakuumu izpari povzroči poškodbe vzorca. Brez dehidracije je možno opazovati le skeletne dele, hitinske strukture in nekatere dele rastlin (Hearle in sod., 1974). Uspeh dehidracije je odvisen od lastnosti uporabljenih tekočin pri zmanjšanju sil površinske napetosti (Waterman, 1980).

Vodo iz vzorca zamenjamo s topili, ki imajo manjšo površinsko napetost in izhlapevajo. Zato so celične membrane in tkiva manj obremenjena in njihova oblika se manj spremeni (Braet in sod.,1996). Običajno dehidracijo opravimo v alkoholni vrsti. Hitrost menjavanja posameznih koncentracij in preskoki v koncentracijah so odvisni od velikosti in permeabilnosti vzorca. Najpogosteje sta uporabljena alkohol in aceton v naraščajočih koncentracijah. Čas inkubacije v posamezni koncentraciji je od 5 do 20 min., odvisno od velikosti objekta in hitrosti difuzije (Watson in sod.,1980). Za daljše hranjenje uporabimo 70-odstotni etanol, ker višje koncentracije po daljšem času lahko povzročajo spremembe na vzorcu. Postopek dehidracije končamo pri 100-odstotni koncentraciji etanola. Običajno nadaljujemo dehidracijo s sušenjem (Sarmiento, 2006).

#### 2.5.2.3 Sušenje

Kot način sušenja se uporablja sušenje na zraku iz medijev, ki imajo majhno površinsko napetost, zamrznjeno sušenje s sublimacijo ledu v vakuumu in sušenje pri kritični točki (CPD).

Sušenje na zraku je postopek s katerim iz vzorca odstranimo vodo ali dehidracijski medij. Praviloma izberemo medije, ki zaradi manjših površinskih sil povzročajo manjše deformacije kot sušenje vode (Waterman, 1980). Uporablja se eter, aceton in nekatera druga topila. Zelo uporaben je hexamethyldisilazane (HMDS). HMDS in drugi intermediji s podobnimi lastnostmi so enostavnejša alternativa postopku CPD (Bray in sod., 1993; Shively in Miller, 2009).

Zamrznjeno sušenje (freeze dryng), je eden od načinov priprave bioloških vzorcev za EM. Pri tem postopku vzorec hitro, globoko zamrznemo pri čemer celična voda zamrzne v amorfní led. Vzorec prenesemo v vakuum, kjer led sublimira in preparat se posuši. S prehodom iz trdne v plinasto fazo obidemo sile površinske napetosti. (Maugel in sod., 1980).

Sušenje pri kritični točki (CPD) je po prevladujočem mnenju optimalna metoda sušenja hidriranih bioloških vzorcev za pripravo preparatov za VEM. Pri kritični točki prehaja

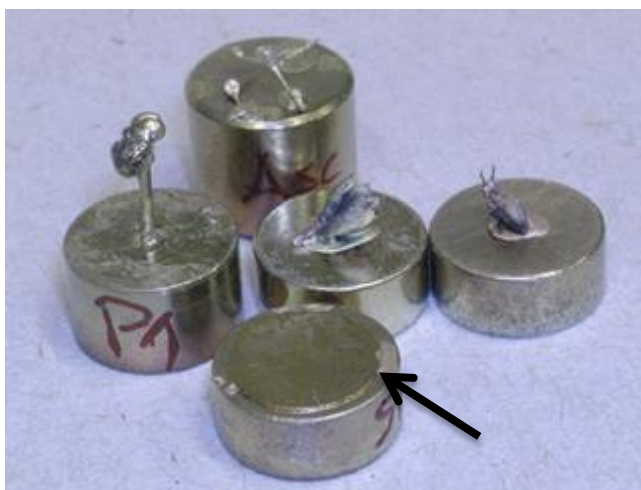
tekočina v plinasto stanje brez fazne meje in z njo povezanih deformacijskih sil površinske napetosti (Atkins, 1990; Watson in sod., 1980). Predhodna dehidracija objekta je potrebna, ker se voda slabo meša s tekočim CO<sub>2</sub>, ki se večinoma uporablja pri tem postopku. (Watson in sod., 1980). Kritična točka je definirana kot točka, kjer sta pri določenih pogojih (temperatura, tlak) gostota plina in tekočine enaka. Izparilna toplota pri in nad kritično točko je enaka nič in razlik med dvema fazama ni več. Pri in nad kritično točko obstaja homogeni ravnotežni sistem, ki se imenuje superkritična tekočina.

#### 2.5.2.4 Namestitev vzorca

Celice, ki jih želimo pregledovati z vrščičnim elektronskim mikroskopom najpogosteje nanašamo na okrogla krovna stekelca. Za pripravo se uporablja vrsta pritrjevalnih sredstev (Scott, 1964). Te nanesejo na krovna stekelca v tankem sloju ter s tem povečamo adhezijo celic na površini (Mazia in sod., 1975).

#### 2.5.2.5 Namestitev in napraševanje preparatov

Če želimo krovno stekelce pogledati z VEM, ga moramo pritrditi na posebni nosilec (Slika 12), ki ga vstavimo v elektronski mikroskop. Kovinski nosilci zagotavljajo veliko toplotno kapaciteto ter toplotno in električno prevodnost. Preparato pritrdimo s srebrno pasto. Večje preparate pritrdimo kar direktno na nosilec, manjše preparate, kot so na primer posamezne celice, pritrdimo najprej na krovno stekelce in nato na kovinski nosilec.



**Slika 12:** Preparati pripravljani za mikroskopiranje z VEM. Na kovinskem nosilcu v ospredju je nalepljeno krovno stekelce, s prilepljenimi celicami (puščica).

Zadnja faza priprave preparata za pregled z VEM je nanos sloja kovine na površino objekta. S tem zagotavljamo električno in termično prevodnost površine preparata. Za ta namen se uporablja zlato, zlitine zlata, platina itd. Prevodna površina, med drugim, preprečuje nastanek artefaktov, poznanih kot nabijanje (charging) ter poveča izplen sekundarnih elektronov in s tem boljši signal. Nanos kovine na površino lahko poteka z napajanjem ali napraševanjem. Pomembno je le, da je debelina nanešenega sloja tanjša od ločljivosti mikroskopa, da ne zakrije podrobnosti na površini objekta (Echlin, 1978).



### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Biološki material**

Uporabili smo 50 vzorcev semena moških obravnavanih v Androloškem laboratoriju (Oddelka za reprodukcijo, Ginekološke klinike v Ljubljani). Pripravili smo 150 preparatov ter posneli 632 mikrografij. Vsi vzorci v naši raziskavi so bili izbrani za poskus uvajanja metode priprave preparata ter za pregled z VEM, po presoji, oceni in potrebi zdravnika.

Poleg tega smo 2 nefiksirana vzorca tkiva moda podgane in 2 parafinska preparata mod podgane dobili na Inštitutu za patološko fiziologijo (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin št. 34401-7/2011/2). Iz omenjenih parafinskih blokov smo izdelali 10 stopničastih serij rezin ter posneli 30 mikrografij.

##### **3.1.2 Kemikalije**

- Aceton (Merck, Nemčija)
- Alcian modro (Alcian Blue 8 GX, Sigma, ZDA)
- Bind-Silan 2% (Pharmacia Biotech, ZDA)
- Dotite (Silver Print- Srebrova pasta, ZDA)
- Etanol (Sigma, ZDA)
- Glutaraldehid 25 % (EM grade SPI Supplies, ZDA)
- HMDS (hexamethyldisilazane) (SPI Supplies, ZDA)
- Klorovodikova kislina (Merck, Nemčija)
- Ksilen (Carlo Erba, Italija)
- Na - kakodilat (Merck, Nemčija)
- Ocetna kislina (Merck, Nemčija)
- Osmijev tetroksid 4% (Osmij)(OsO<sub>4</sub>, SPI Supplies, ZDA)

- Paraformaldehid (Merck, Nemčija)
- Poly-L-Lysin 0,1% (Sigma Diagnostic, ZDA)

### 3.1.3 Oprema

- 0,2  $\mu$  filter (Millipore, ZDA )
- Centrifuga MIKRO 220R (Hettich, Nemčija)
- Centrifugirke 1,5 mililitrske (Eppendorf, Nemčija)
- Krovna stekelca,  $\Phi$  10mm (Agar, Austrija)
- Mikrotom RM 2235 (Leica, Nemčija)
- Millipore Filter Holder - Membranski filtrirni sistem (Analytical Stainless steel Filter Holder, Millipore glass filtration system) (Millipore, Nemčija)
- Naprava za sušenje Balzers critical point dryer CPD 030 (Balzers, Finska)
- Napraševalec Balzers SCD 050 (Balzers, Finska)
- Steklovina
- Vrstični elektronski mikroskop JEOL FESEM 7500 (Jeol, Japonska)

## 3.2 METODE

Za izbor optimalne metode priprave preparatov za VEM smo preizkusili več postopkov. Z ozirom na utečeno laboratorijsko prakso in predhodne raziskave smo predvideli sledečo shemo priprave vzorcev in izdelave preparatov.

### 3.2.1 Priprava vzorca

Vzorci semena so bili pripravljani po standardnem protokolu Androloškega laboratorija Ginekološke klinike v Ljubljani z metodo centrifugiranja skozi viskozni gradient (angl. density gradient centrifugation). Pri tej metodi se vzorce semena centrifugira skozi različno goste frakcije gojišč kar selekcionira semenčice. V najgostejši frakciji ostanejo semenčice, ki so očiščene semenske plazme, bakterij, levkocitov, mrtvih semenčic, celičnega ostanka, epitelnih celic itd. (Kovačič, 2014).

Nadaljnja priprava vzorca in izdelava preparata je potekala na Inštitutu za histologijo in embriologijo Medicinske fakulteta Univerze v Ljubljani. Vzorce smo centrifugirali 10 min. pri 1400 obratih na min. (rpm), supernatant smo zavrgli, pelet pa resuspendirali v 0,1 M Na - kakodilatnem pufu.

### 3.2.2 Izdelava preparata na krovnem stekelcu

#### 3.2.2.1 Fiksacija

V okviru magistrske naloge smo preiskusili tri načine fiksacije. Najprej smo želeli preveriti, če dvostopenjski postopek fiksacije (fiksacija z aldehidi in postfiksacija z osmijevim tetraoksidom) zagotavlja tudi pri fiksaciji semenčic, ustrezne rezultate. Protokol je bil zasnovan in preizkušen za pripravo preparatov živalskih tkiv za VEM (Rode 1991; Andjelić, 2015). V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, če je mogoče dvostopenjsko fiksacijo poenostaviti z enostopenjsko, samo z aldehidnim fiksativom ali samo z osmijem, ne da bi to vplivalo na kvaliteto preparatov.

Potek fiksacije in spiranja je potekal po sledečem protokolu:

- Fiksacija I: aldehidni fiksativ 30 min., spiranje 3x5 min., osmij 30 min., spiranje 3x5 min.
  - Fiksacija II: osmij 30 min., spiranje 3x5 min.
  - Fiksacija III: aldehidni fiksativ 30 min., spiranje 3x5 min.
- Dvostopenjska aldehidna fiksacija (fiksacija I)
- 1 % glutaraldehid, 0,4 % formaldehid v 0,1% M kakodilatnem pufru, pH= 7,2. cca 300 - 400 mOsm. Čas fiksacije 30 min.
  - postfiksacija z 1 % osmijevim tetroksidom ( $\text{OsO}_4$ ) v 0.1 M Na-kakodilatnem pufru. Čas postfiksacije 30 min.
- Fiksacija z osmijem (fiksacija II)
- 1% osmij v 0.1 M Na-kakodilatnem pufru. Čas fiksacije 30 min.
- Fiksacija s standardnim aldehidnim fiksativom (fiksacija III)
- 1 % glutaraldehid, 0,4 % formaldehid v 0,1% M kakodilatnem pufru. Čas fiksacije 30 min.

Po fiksaciji smo vzorce sprali s kakodilatnim pufrom. Pri vsaki zamenjavi pufra smo odlili supernatant ter pelet resuspendirali v svežem pufru. Tako smo odstranili ostanke fiksativa.

#### 3.2.2.2 Lepljenje celic na krovna stekelca

Suspenzijo fiksiranih in spranih semenčic smo lepili na krovna stekelca. Preizkušali smo moč prilepljanja na krovna stekelca s prevlekami z Alcian modrim, Poly-L-Lysinom in Bind-Silanom.

#### Priprava krovnih stekelc z adhezivom Alcian modrim (Alcian Blue)

Pripravili smo 1% raztopino barvila Alcian modrega v destilirani vodi, raztopino smo centrifugirali (15000g, 15 min.) in supernatant prefiltrirali skozi 0,2 µ filter. V 5 ml pripravljene raztopine barvila smo dodali 50 µl koncentrirane očetne kisline. Krovna stekelca smo očistili, razmastili z acetonom in posušili na zraku. V pripravljene raztopini smo jih inkubirali 20 min., sprali z destilirano vodo in posušili na zraku.

#### Priprava krovnih stekelc z adhezivom Poly-L-Lysinom

Komercialno raztopino 0,1% Poly-L-Lysin smo pripravili z destilirano vodo v razmerju 1:10, tik pred nanosom na krovna stekelca. Na razmaščena stekelca smo kanili kapljico pripravljene raztopine in jih posušili v sušilniku pri 37°C.

#### Priprava krovnih stekelc z adhezivom Bind-Silanom

Uporabili smo 2% raztopino Bind-Silan v acetonu. Pripravljena krovna stekelca smo namakali 20 min. v raztopini Bind-Silana v acetonu. Nato smo jih 2 krat sprali v acetonu, 2 krat v destilirani vodi ter posušili v sušilniku pri 37°C.

Po fiksaciji in spiranju smo na krovna stekelca nanесли kapljico spranega vzorca. Po 30 min. inkubacije v vlažni komori na sobni temperaturi smo pribitek vzorca odlili.

#### 3.2.2.3 Dehidracija

Prilepljene celice na krovna stekelca smo dehidrirali v alkoholni vrsti.

- 50-odstotni etanol            5 min.
- 70-odstotni etanol            5 min.
- 80-odstotni etanol            5min.
- 90-odstotni etanol            5min.

- 96-odstotni etanol                      5min.
- absolutni etanol                        5min.

#### 3.2.2.4 Sušenje

Dehidrirane preparate smo sušili na dva načina. Uporabili smo sušenje pri kritični točki in sušenje s HMDS.

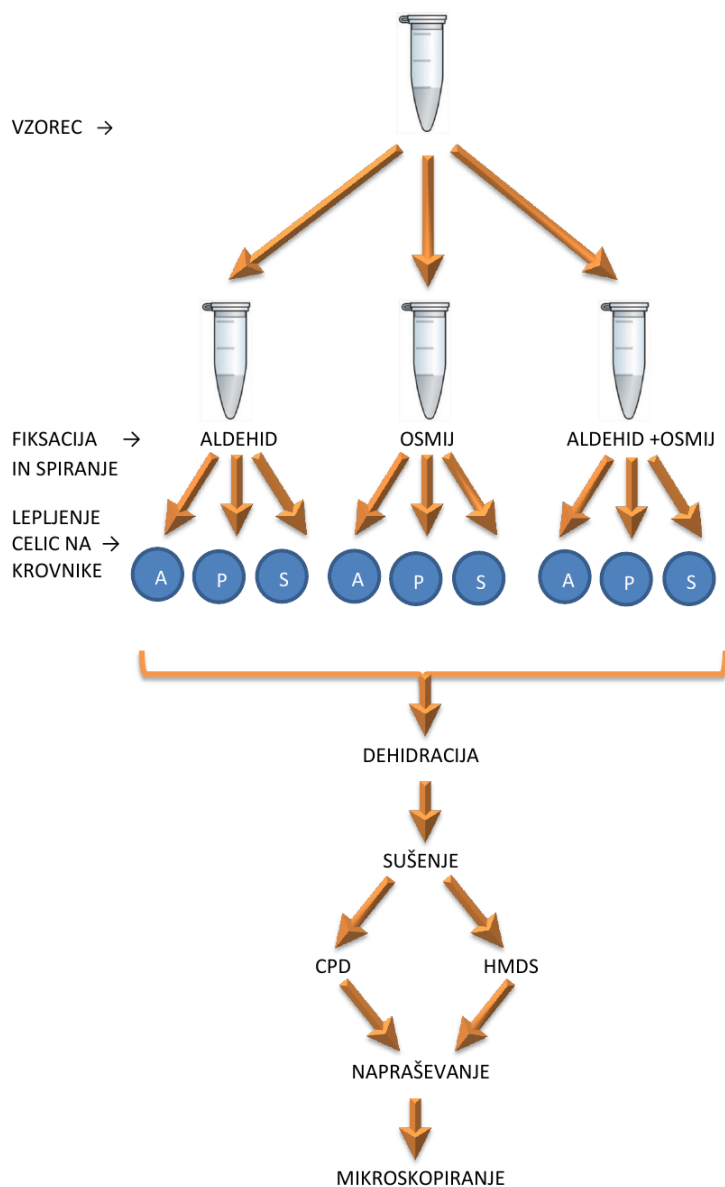
V postopku sušenja pri kritični točki smo preparate namestili v poseben nosilec za sušenje in jih posušili pri kritični točki s CO<sub>2</sub>. Uporabljali smo napravo Balzers critical point dryer CPD 030. V drugem postopku sušenja, smo dehidrirane vzorce na krovnih stekelcih spirali s HMDS in jih posušili na zraku.

#### 3.2.2.5 Pritrditev preparata na nosilec in napraševanje

Posušene preparate smo s srebrno pasto nalepili na kovinske nosilce in naprašili s platino. Uporabili smo napraševalec Balzers SCD 050. Da bi dobili ustrezne debeline nanosa, smo napraševali 5-10 min., pri napetosti 1 kV in toku 10mA.

#### 3.2.2.6 Mikroskopiranje in izdelava mikrografij

Tako pripravljene preparate smo pregledovali z vrščičnim elektronskim mikroskopom JEOL FESEM 7500 (Slika 13).



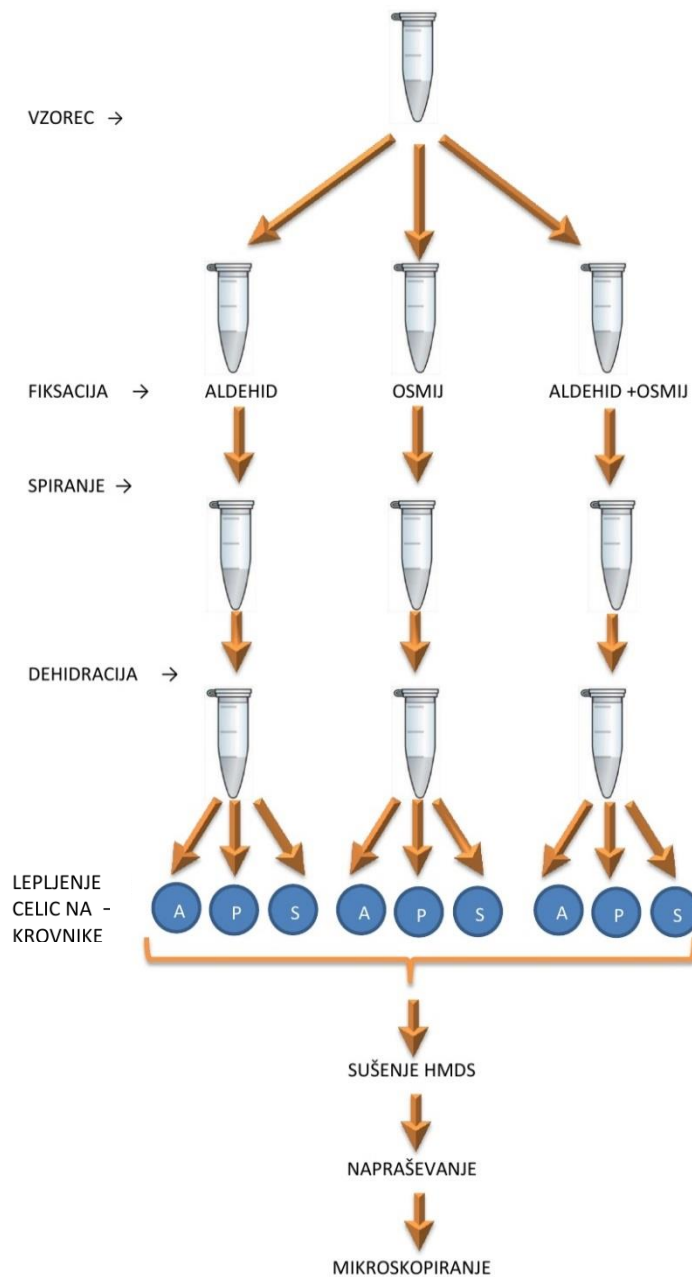
**Slika 13:** Shema poteka priprave preparata s tremi različnimi fiksacijami (aldehidni fiksativ, osmij ali dvostopenjska aldehidna fiksacija), lepljenje na krovna stekelca prevlečena z različnimi adhezivi (A: Alcian modrim, P: Poly-L-Lysin, S: Silan), spiranjem, dehidracijo in sušenjem s CPD ali HMDS.

Pri pregledovanju krovnih stekelc z VEM smo ugotovili, da v fazi spiranja, dehidracije in sušenja občasno prihaja do odlepljanja celic in s tem do izgube vzorca. V nadaljevanju poskusa smo spiranje, dehidracijo in sušenje izvajali v centrifugirkah.

### **3.2.3 Dehidracija v centrifugirkah in sušenje semenčic s HMDS**

V dopolnjenem postopku smo spiranje, dehidracijo izvajali v 1,5 ml centrifugirkah (Slika 14). Po fiksaciji smo vzorce sprali s kakodilatnim pufrom. Sledila je dehidracija v alkoholni vrsti do absolutnega etanola. Po vsakem koraku postopka smo vzorce koncentrirali s centrifugiranjem pri 1400 obratih na min. ter dobljeni pelet dispergirali z višjo koncentracijo etanola. Kot zadnji medij smo uporabili HMDS. Resuspendirane celice v centrifugirkah smo šele nato nanесли na krovna stekelca ter jih posušili na zraku. Preparate smo nalepili na nosilce, naprašili s platino ter pregledali z VEM.





**Slika 14:** Shema poteka priprave preparata v centrifugirkah. Uporaba treh različnih fiksacij (aldehydni fiksativ, osmij ali dvostopenjska aldehydna fiksacija), spiranje, dehidracija in nato lepljenje celic na krovna stekelca (prevleka z A: Alcian modrim, P: Poly-L-Lysin, S: Silan) ter sušenje s HMDS.

Tudi pri tem postopku smo ugotavljali občasno odlepljanje celic med postopkom. Kot rešitev smo preizkusili pripravo preparatov na membranskem filtru.

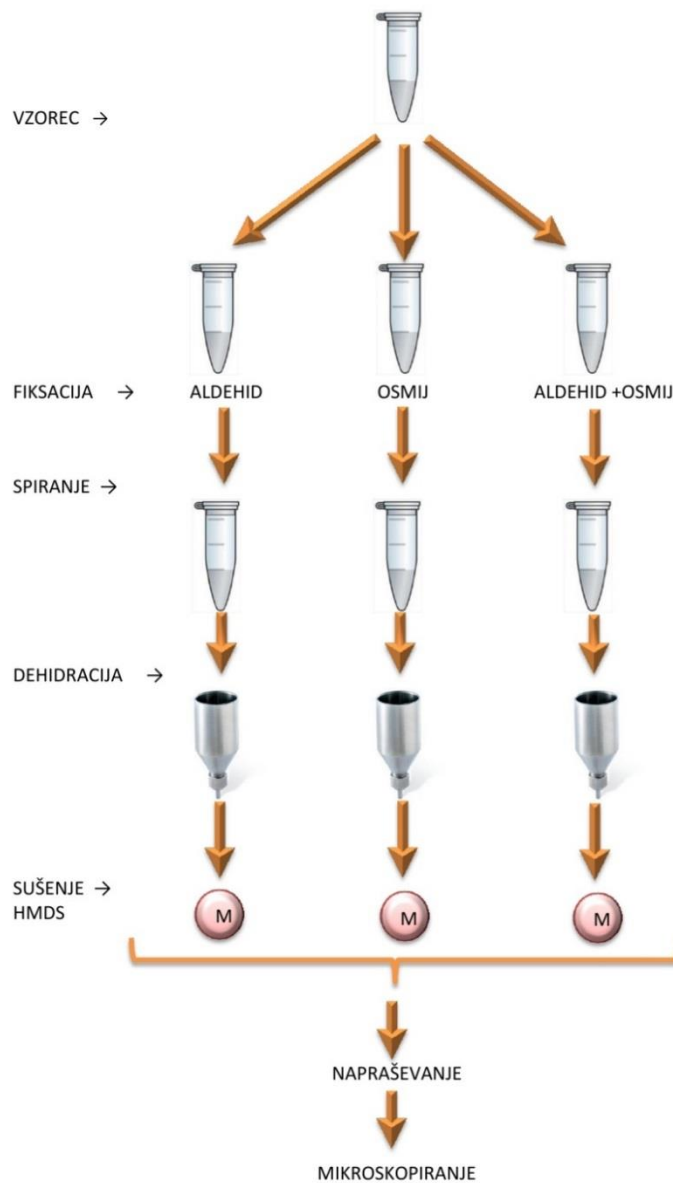
### 3.2.4 Priprava preparatov na membranskem filtru

Za pripravo preparatov smo uporabili improvizirano filtrirno napravo sestavljeno iz filtrirnega lijaka (Millipore Filter Holder, Millipore glass filtration system), membranskega filtra in presesalne stekleničke (Slika 15). Po fiksaciji in spiranju v centrifugirkah smo vzorce nanесли na Millipore membranski filter z 0.2  $\mu$  porami, vpetim v filtrirni lijak. Uporabili smo utečeni postopek dehidracije, spiranja in sušenja. S podtlakom v posodi pod lijakom smo zagotovili pretok tekočine skozi membrano in s tem kontinuirano dehidracijo z alkoholi in inkubacijo s HMDS. S tem smo se izognili večkratnemu centrifugiranju in dispergiranju vzorca ter poškodbam in izgubam materiala (Slika 16).

**A**



**Slika 15:** Millipore Filter Holder (A) in improvizirani sistem za filtracijo (B), ki smo ga pri našem delu uporabljali za pripravo preparatov za VEM.



**Slika 16:** Shema poteka priprave preparata na membranskem filtru. Uporaba treh fiksacij (aldehidni fiksativ, osmij ali dvostopenjska aldehidna fiksacija), spiranje, nanos vzorca na membranski filter (M), dehidracija in sušenje s HMDS.

### **3.2.5 Priprava preparatov iz nefiksiranega tkiva mod podgane**

Pri pripravi preparatov iz nefiksiranega tkiva smo sledili osnovnemu protokolu (Fiksacija I). Dobljene koščke tkiva smo 30 min. fiksirali v aldehidnem fiksativu. Delno fiksirano tkivo smo narezali na 2 mm velike koščke in jih v aldehidnem fiksativu fiksirali še 2 uri. Po fiksaciji smo preparate sprali s 0,1 M kakodilatnim pufrom. Sledila je postfiksacija z osmijem, dehidracija v alkoholni vrsti in sušenje pri kritični točki. Vzorce smo prilepili s srebrno pasto na standardne nosilce za preparat in naprašili s platino.

### **3.2.6 Priprava preparatov iz parafinskih vzorcev**

Za pripravo rezin smo uporabili parafinska bloka s tkivom podganjega moda. Tkivo je bilo fiksirano v 4% formalinu, dehidrirano in vklopljeno v parafin. Z mikrotomom Leica RM 2235 smo iz bloka narezali 10 stopničastih serij rezin debeline 200 $\mu$ m. Rezine smo deparafinizirali v ksilenu, sprali z absolutnim etanolom in jih posušili pri kritični točki. Posušene rezine smo s karbonsko folijo prilepili na nosilce za preparat ter naprašili s platino.

Tako pripravljene preparate smo pregledovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

## 4 REZULTATI

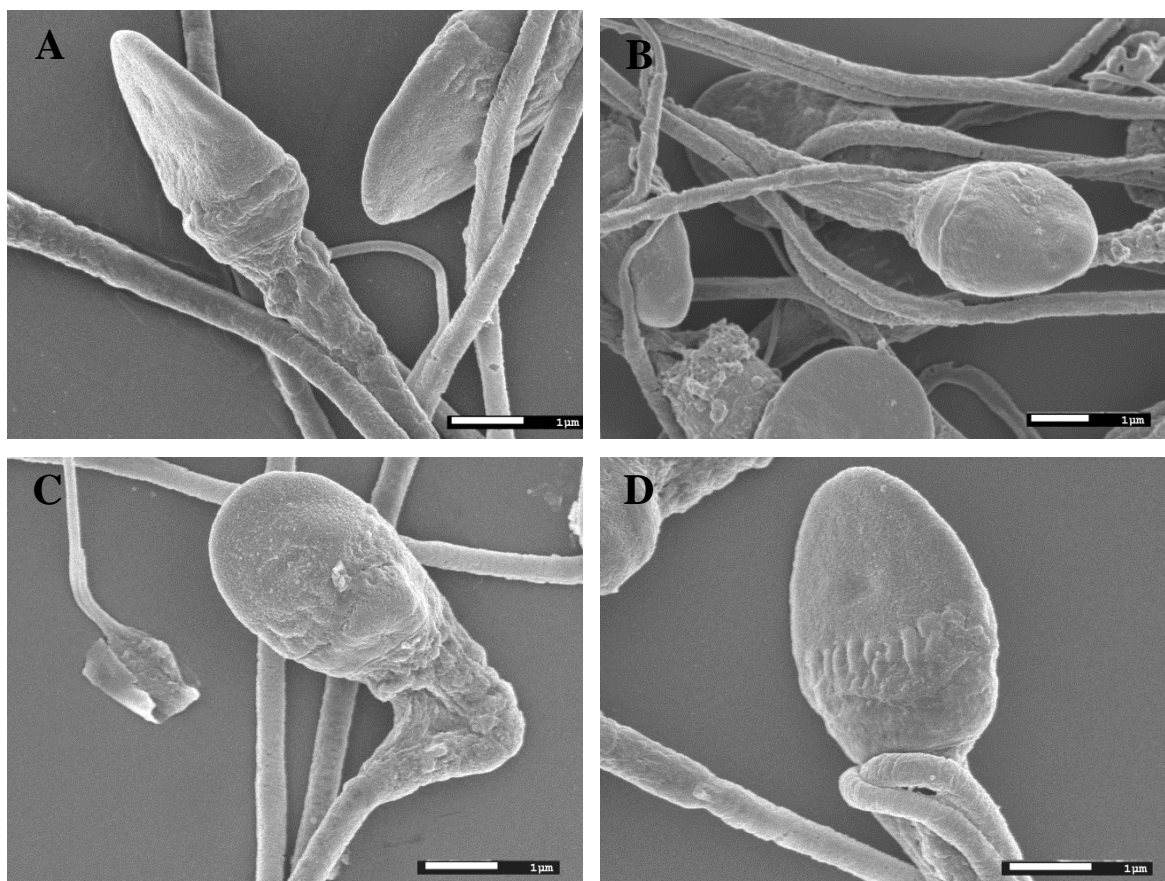
Moja naloga v okviru magistrskega dela je bila razviti in optimizirati metodo priprave preparatov semenčic moških, vključenih v postopke zdravljenja neplodnosti. Med znanimi postopki smo želeli izbrati metodo, ki je zanesljiva in ponovljiva, odraža realno sliko vzorca ter je primerna za rutinsko uporabo.

### 4.1 FIKSACIJA VZORCEV ZA VEM

Pri naši nalogi smo preizkusili tri postopke: fiksacijo z aldehidnim fiksativom ter postfiksacijo z osmijem, fiksacijo samo z osmijem in fiksacijo samo z aldehidnim fiksativom.

#### 4.1.1 Fiksacija z aldehydним fiksativom in postfiksacija z osmijem

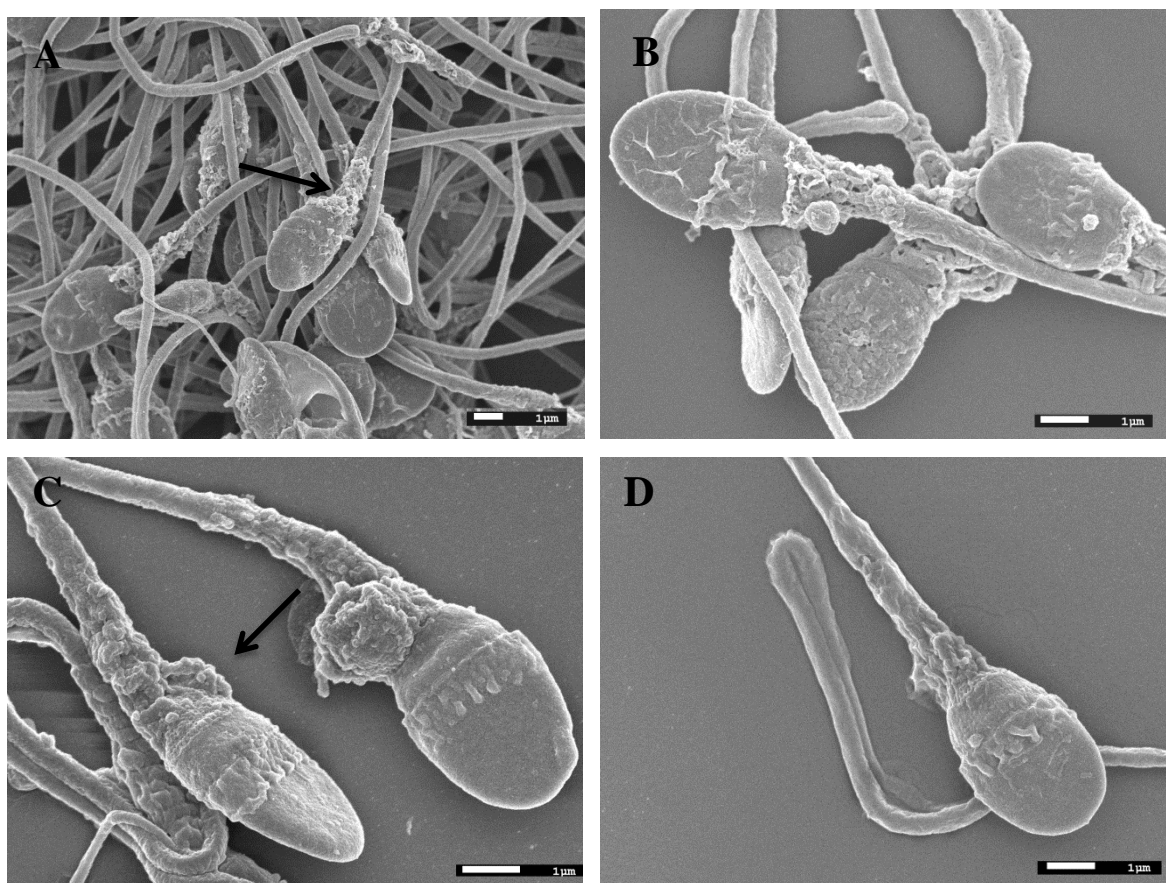
Za fiksacijo z aldehydним fiksativom in postfiksacijo z osmijem smo pripravili 25 vzorcev semena iz katerih smo naredili 80 preparatov ter pregledali 310 mikrografij. Metoda dvostopenjske fiksacije z aldehydним fiksativom ter postfiksacijo z osmijem, ki je bila predhodno že večkrat preizkušena se je tudi pri našem poskusu pričakovano izkazala za najboljšo (Slika 17). Pri tej kombinaciji fiksacij je struktura celic nepoškodovana. Razpok na površini semenčic je malo, glava in vrat sta ohranjena. Rep je brez razjed in gladek. Mikrografije so kontrastne in praviloma brez motečega nabijanja. Ocenjujemo, da postopek zagotavlja optimalno ohranitev strukture površine semenčic.



**Slika 17:** Slika kaže značilne mikrografije štirih različnih preparatov. Vzorci so bili fiksirani po dvostopenjskem protokolu z aldehydi in osmijem. Površina glav je intaktna (A, D) razpoke na repih so neznatne oziroma komaj opazne (B, C).

#### 4.1.2 Fiksacija z osmijem

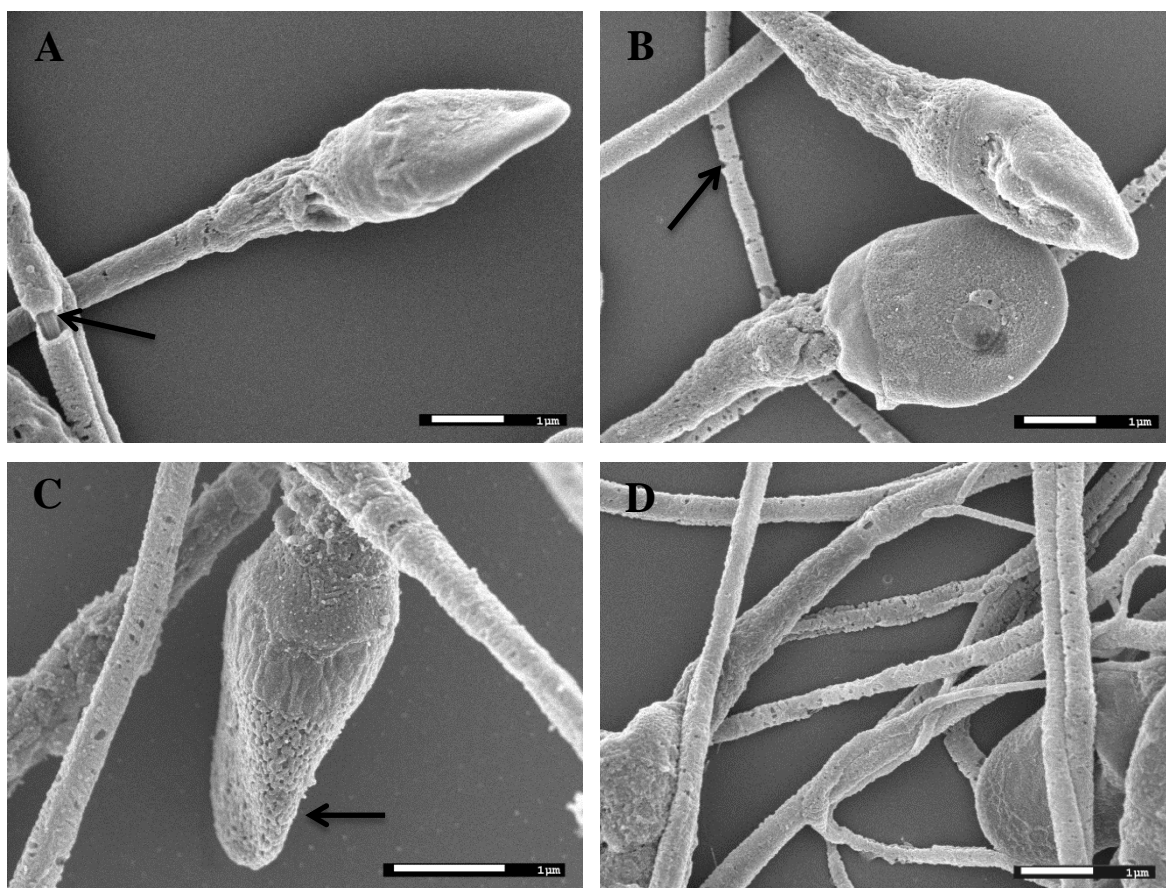
V klasičnih histoloških recepturah smo zasledili rabo osmija kot priporočenega fiksativa za spolne celice, vključno s semenčicami (Romeis B. 1968). Metodo fiksacije z osmijem smo preizkusili na 16 vzorcih semena iz katerih smo pripravili 40 preparatov in posneli 117 mikrografij. Izkazalo se je, da so strukture glave, vratu in repa dobro ohranjene. Na preparatih ni vidnih večjih in očitnih razpok in razjed repa. Ocenjujemo, da so semenčice dobro fiksirane. Raba osmija zagotavlja dober elektronski kontrast (Slika 18).



**Slika 18:** Slika kaže značilne mikrografije štirih različnih preparatov vzorcev, fiksiranih samo z osmijem. Površina glav je intaktna, razpoke na repih so večinoma neznatne (B, C, D). Na površini celic je opaziti več celičnega ostanka (puščica), ki bi lahko bila posledica nezadostnega spiranja vzorca ali hitre in nezadostne fiksacije z osmijem (A, B).

### 4.1.3 Fiksacija z aldehidi

Metodo fiksacije z aldehidi smo preizkusili na 28 vzorcih semena iz katerih smo pripravili 30 preparatov in posneli 205 mikrografij. Glede na predhodnje izkušnje se je izkazalo, da je med izbranimi metodami fiksacija samo z aldehidnim fiksativom (Slika 19) najslabša. Opazno je površina glave in vratov semenčic slabše ohranjena. Očitne so razpoke in globoke razjede pri vseh repih na vseh preparatih. Kontrast pri mikroskopiranju je slab. Na podlagi teh znakov ocenjujemo, da postopek ne zagotavlja optimalne fiksacije in postopek ni primeren za rutinsko rabo.



**Slika 19:** Slika kaže značilne mikrografije štirih različnih preparatov vzorcev, ki so bili fiksirani samo z aldehidnim fiksativom. Površina glave je dobro ohranjena (A, B), na sliki so vidne površinske razjede na glavi (C) (puščica), na repih (A, B, C, D) so vidne razpoke in globoke razjede (puščica).

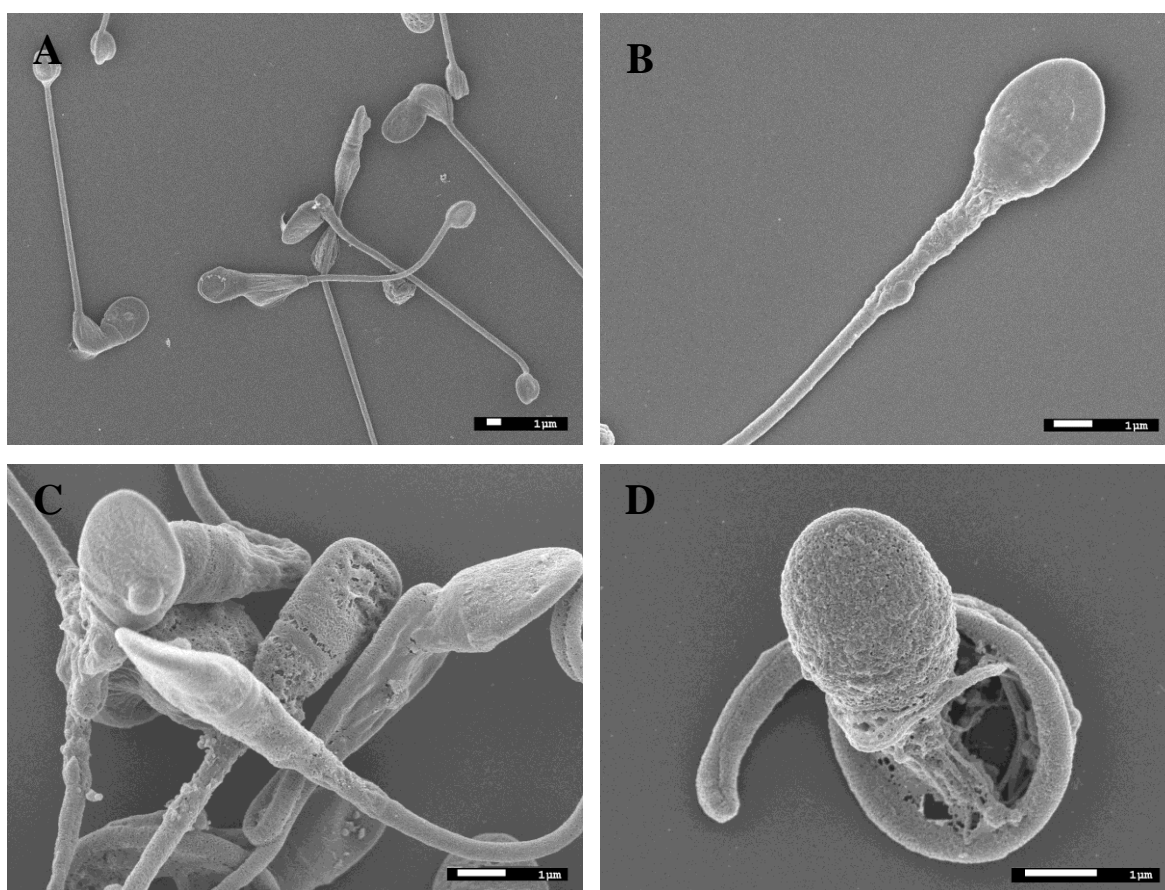


## 4.2 LEPLJENJE SEMENČIC NA KROVNA STEKELCA

V predhodnih poskusih priprave preparatov smo že dobili uporabne rezultate s prilepljanjem različnih celic na krovna stekelca (Pollak, 2003). Preizkusili smo tri protokole lepljenja celic na krovna stekelca, da bi ugotovili katera metoda je najbolj ustrezna za pripravo preparatov semenčic za VEM. Uporabili smo adheziv Alcian modro, Poly-L-Lysin in Bind-Silan.

#### 4.2.1 Premaz krovnih stekelc z Alcian modrim

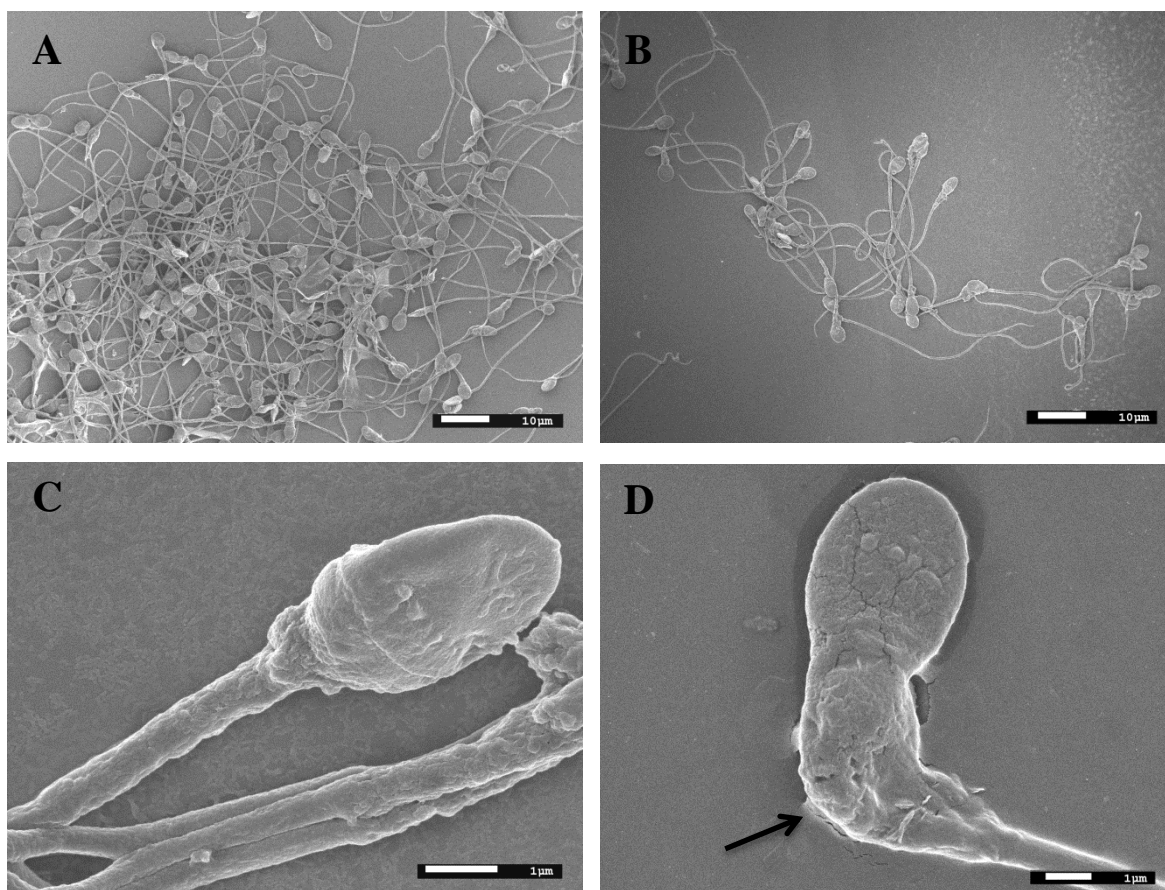
Kot najugodnejši način se je izkazala priprava krovnih stekelc z Alcian modrim (Slika 20). Pripravili smo 40 preparatov in posneli 245 mikrografij. Adhezivna prevleka je tanka, kar omogoča prilepljanje celic v tankem sloju ter daje možnost natančnega pregledovanja posameznih struktur semenčice. Pri vseh preparatih je ozadje čisto brez motečih struktur. Priprava krovnih stekelc in celoten postopek je v primerjavi z ostalima postopkoma najbolj enostaven. Krovna stekelca s suho prevleko so obstojna do dva tedna in so lahko pripravljena na zalogo.



**Slika 20:** Nekaj značilnih mikrografij semenčic prilepljenih na krovna stekelca prevlečena s plastjo Alcian modrega. Prilepljanje celic v tankem sloju (A, B, D) ali v gruči (C). Dobro prilepljanje in čistost ozadja omogoča natančen pregled in preučevanje struktur semenčic.

#### 4.2.2 Premaz krovnih stekelc s Poly-L-Lysinom

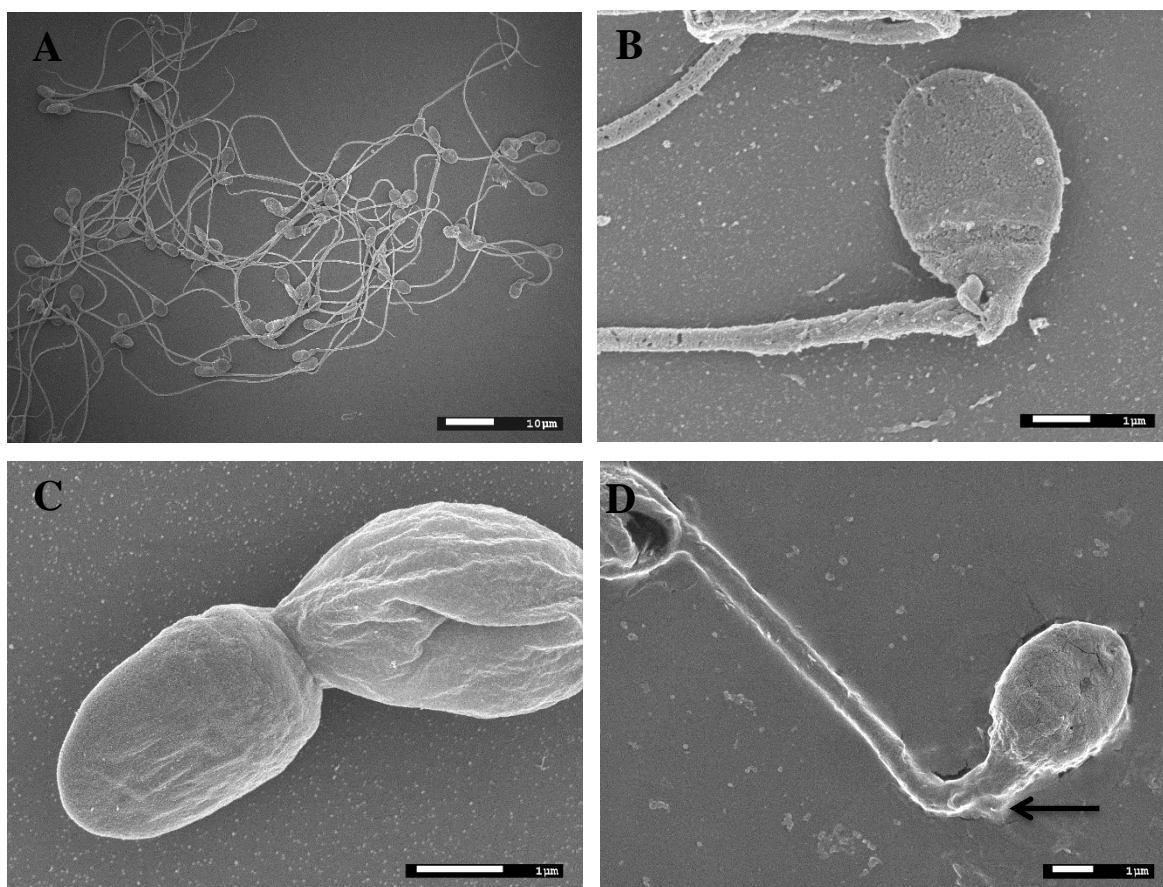
Lepljenje semenčic s Poly-L-Lysinom je prikazano na sliki št.21. Pripravili smo 40 preparatov in posneli 105 mikrografij. Prilepljanje celic na krovna stekelca je v večini dobro in primerljivo z Alcian modrim in Bind-Silanom. Plast Poly-L-Lysina pogosto ni dovolj enakomerna in tanka, kar se kaže kot nehomogeno ozadje. Na nekaterih krovnih stekelcih smo dobili predebelo plast adheziva v katero so se nanesele celice pogreznele. Priprava krovnih stekelc je daljša in bolj zapletena, kar podaljša čas priprave preparata.



**Slika 21:** Nekaj značilnih mikrografij semenčic prilepljenih na krovna stekelca prevlečena s plastjo Poly-L-Lysina. Prilepljanje celic v več plasteh (A). Nehomogeno razporejeno adhezivno sredstvo (B, C, D). Predebelo naneseano adhezivno sredstvo povzroča ugreznjenje celic (puščica) (D).

### 4.2.3 Premaz krovnih stekelc z Bind-Silanom

Preizkusili smo tudi pripravo krovnih stekelc z Bind-Silanom. Pripravili smo 40 preparatov in posneli 110 mikrografij. Polovica preparatov je bila brez ozadja in celice so bile dobro vezane na površino. Ostala krovna stekelca so imela sloj razporejen nehomogeno ali pa so se vezale druge, verjetno lastne strukture adhezivnega sredstva. Ravno tako kot pri Poly-L-Lysinu smo imeli tudi pri tej metodi težavo z nanašanjem predebelega sloja. Na tako pripravljenih krovnih stekelcih so se celice ugreznile, kar preprečuje pregled morda pomembnih struktur (Slika 22).



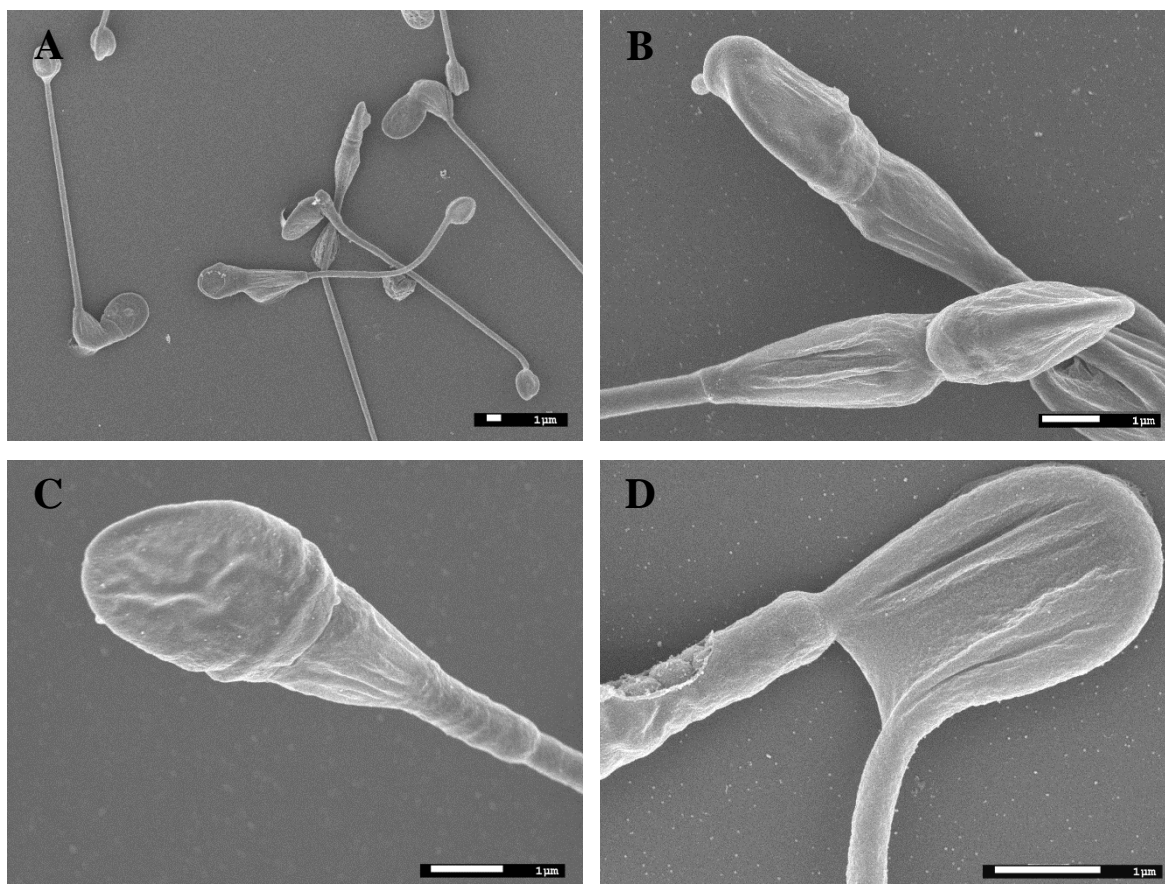
**Slika 22:** Nekaj značilnih mikrografij semenčic prilepljenih na krovna stekelca prevlečena s Bind-Silanom. Dobro lepljenje z Bind-Silanom (A). Moteča zrnatost ozadja (B, C). Celice so ugreznjene v lepilni plasti (puščica) (D).

### 4.3 SUŠENJE VZORCEV ZA VEM

V naši nalogi smo preiskusili dva načina sušenja: sušenje pri kritični točki in sušenje s HMDS.

#### 4.3.1 Sušenje pri kritični točki (CPD)

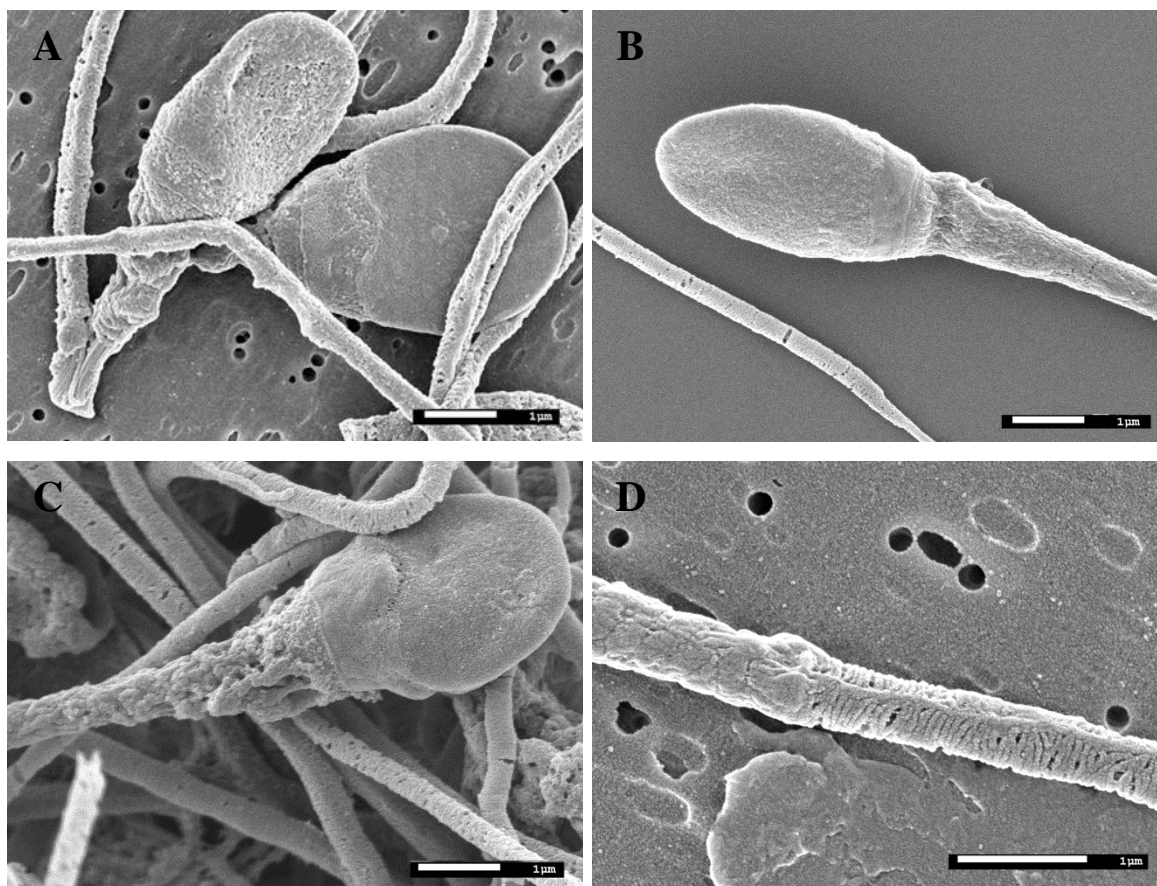
Metodo sušenja pri kritični točki smo preizkusili na 30 preparatih ter posneli 155 mikrografij. Je najbolj pogosta in priporočena metoda za vrščično elektronsko mikroskopijo. Ker pri sušenju pri kritični točki prehaja tekočina v plinasto stanje brez fazne meje, ni sil površinske napetosti, ki sicer poškodujejo strukturo vzorca, kar se vidi na vseh mikrografijah. Za določene namene priprave vzorcev semenčic za VEM je CPD optimalna metoda (Slika 23).



**Slika 23:** Štiri mikrografije semenčic, prikazujejo uspešno izpeljan postopek sušenja pri kritični točki. Površina celic je napeta, artefakti tipični za sušenje so komaj opazni (B,C,D). Nedeformiran del preostale citoplazme na repu semenčice (D) je znak uspešno izvedenega postopka.

#### 4.3.2 Sušenje s HMDS

Kot alternativo metodo sušenju pri kritični točki smo uporabili sušenje s HMDS (Slika 24). Pripravili smo 120 preparatov in posneli 477 mikrografij. Poškodbe na površini semenčic, ki nastanejo med sušenjem s HMDS so večje, bolj opazne, kot to zasledimo pri sušenju s CPD. HMDS zaradi večje agresivnosti najeda celično površino in s tem povzroča poškodbe, vendar še vedno dovolj majhne, da zagotovimo zadovoljliv rezultat.



**Slika 24:** Značilne mikrografije semenčic, ki so bile posušene s HMDS prikazujejo razjede in poškodbe struktur na repih (A, B, C, D).

#### 4.4 DEHIDRACIJA V CENTRIFUGIRKAH IN SUŠENJE SEMENČIC S HMDS

Po pregledovanju krovnih stekelc pripravljenih po opisanih metodah smo ugotovili, da se iz njih nekontrolirano odplavljajo semenčice. Tako smo pri nekaterih poskusih izgubili do polovice preparatov.

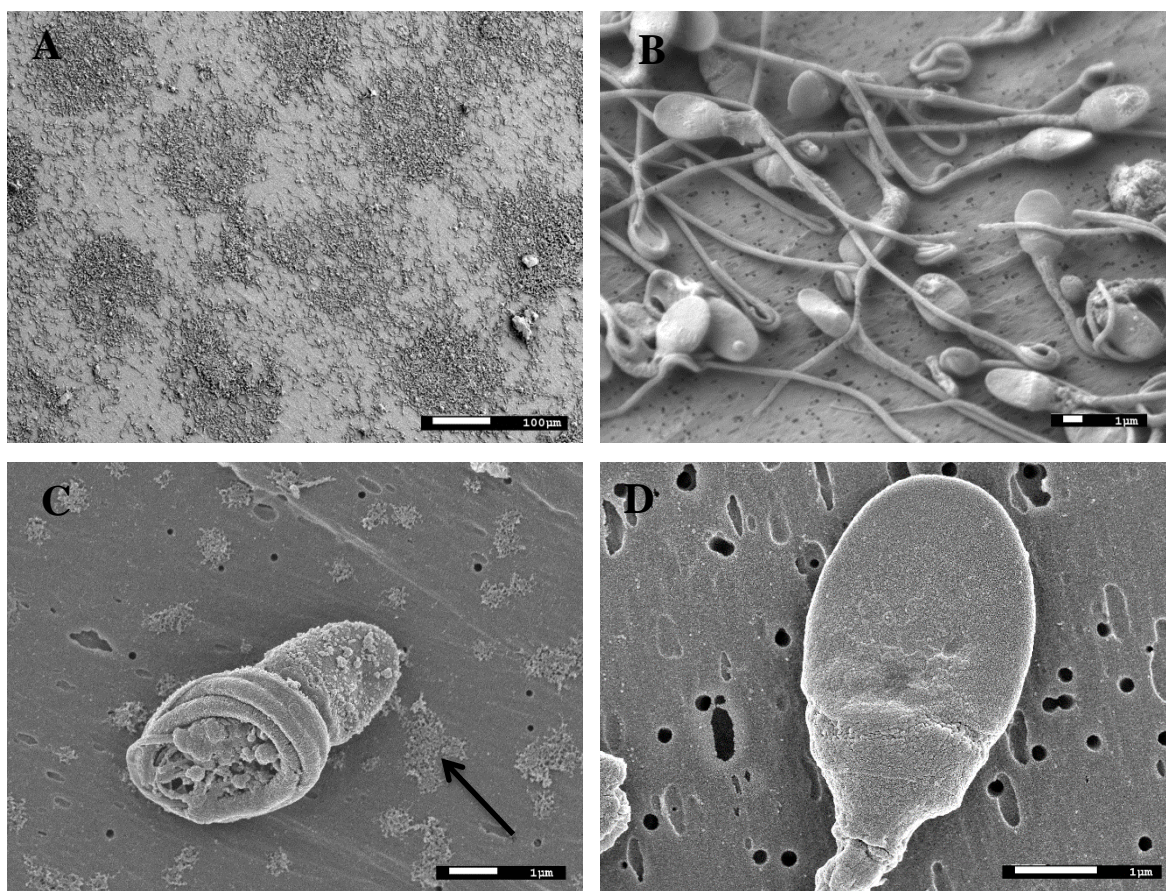
Zaradi odplavljanja celic smo postopek dehidracije in sušenja zastavili drugače in ustrezno prilagodili. Ves postopek priprave preparatov smo izvajali v centrifugirkah. Tako prilagojen postopek je preprečil, da bi se celice odplavljale že med spiranjem in dehidracijo. V centrifugirki smo semenčice prevedli v HMDS in jih šele nato nanесли na krovna stekelca ter jih posušili na zraku. Slabost dela s suspenzijami je, da se s številnimi centrifugiranjem za koncentriranje vzorca in resuspendiranjem, celice izgubljajo in poškodujejo. Ugotovili smo, da je tudi pri tem postopku prihajalo do izgub vzorca zaradi slabega lepljenja, nekontroliranega odplavljanja ali drugih neugotovljenih vzrokov.

#### 4.5 PRIPRAVA PREPARATOV ZA VEM NA MEMBRANSKEM FILTRU

Sistem priprave preparatov smo zaradi izgube vzorca pri predhodnih metodah dopolnili tudi z uporabo membranskega filtra. Pripravili smo 30 preparatov in posneli 172 mikrografij. Prednost postopka je, da smo se izognili večkratnemu centrifugiranju in dispergiranju vzorca, saj smo dehidracijo in sušenje izvedli v kontinuiranem procesu. S tem smo se izognili izgubi materiala in poškodbam celic.

Metoda je zelo primerna za rutinsko uporabo, kjer želimo hiter rezultat z nezatno izgubo in poškodbo vzorca. Postopek pokaže svojo uporabnost predvsem pri delu z občutljivimi vzorci ali, ko vzporedno potekajo še drugi testi in je zaradi tega razpoložljivi volumen semena manjši ali močno razredčen. Slabost postopka je, da se poleg vzorca na membranski filter ujamejo različne nečistoče, ki lahko prekrijejo površino preparata. Temu se izognemo, če pri delu zagotovimo visok nivo čistosti kemikalij, reagentov in poteka dela (Slika 25).



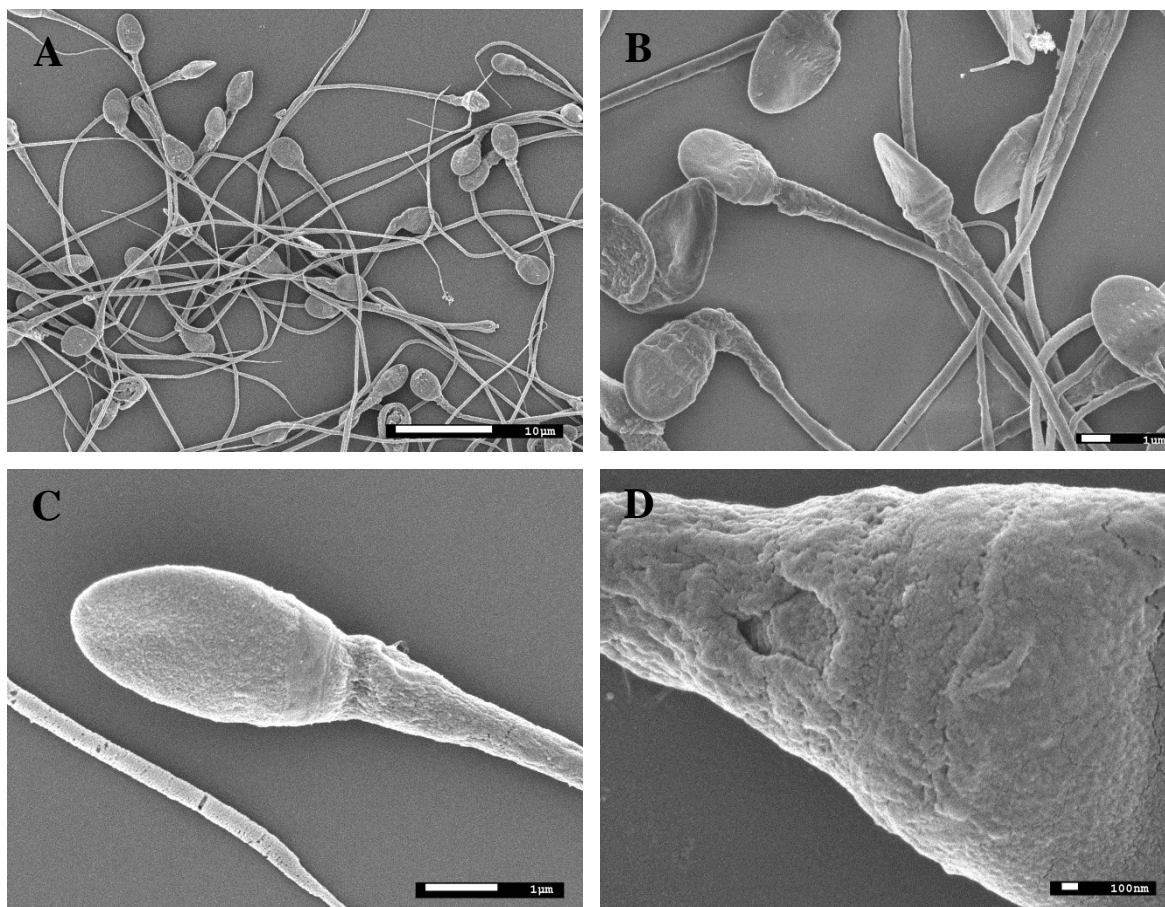


**Slika 25:** Nekaj primerov značilnih mikrografij semenčic na membranskem filtru. Zbiranje semenčic na področju por na podlogi membrane (A). Semenčice ujete na nosilcu (B). Fina struktura filtra preprečuje izgube materiala Poleg semenčice ujete tudi nečistoče (C) (puščica). V ozadju vidna značilna površina membranskega filtra s porami (D).

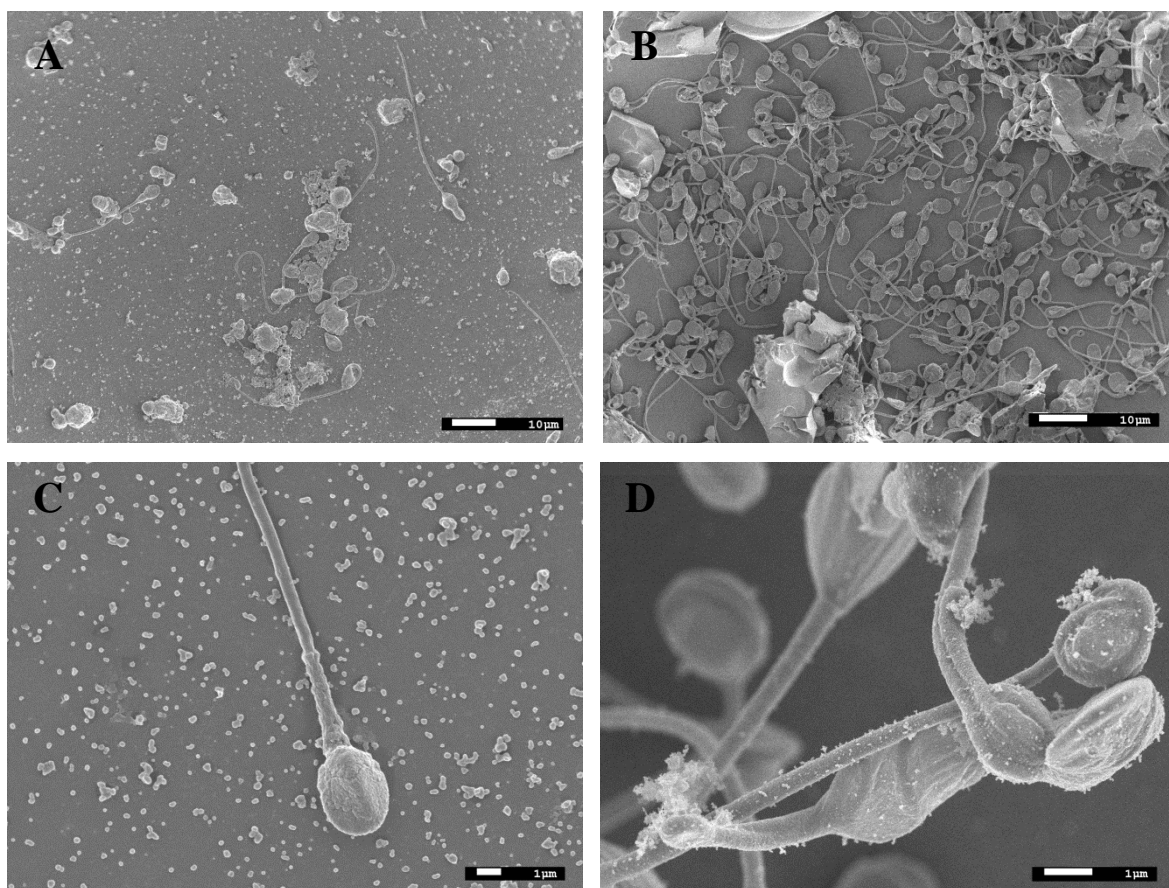
#### 4.6 ČISTOST VZORCA IN PREPARATOV

Idealna slika preparata, je slika čiste strukture brez tujkov. (Slika 26). Do nečistoč na površini prihaja na več načinov: iz samega vzorca (ostanki semenske tekočine, sluzi, delci drugih tkiv) ali pri postopku priprave preparata z nečistimi kemikalijami in reagenti ter z nekorektno izvedbo protokolov (Slika 27).





**Slika 26:** Mikrografije semenčic iz štirih različnih vzorcev. Ne na površini celic, niti na ozadju ni onesnaženja (A, B, C, D).

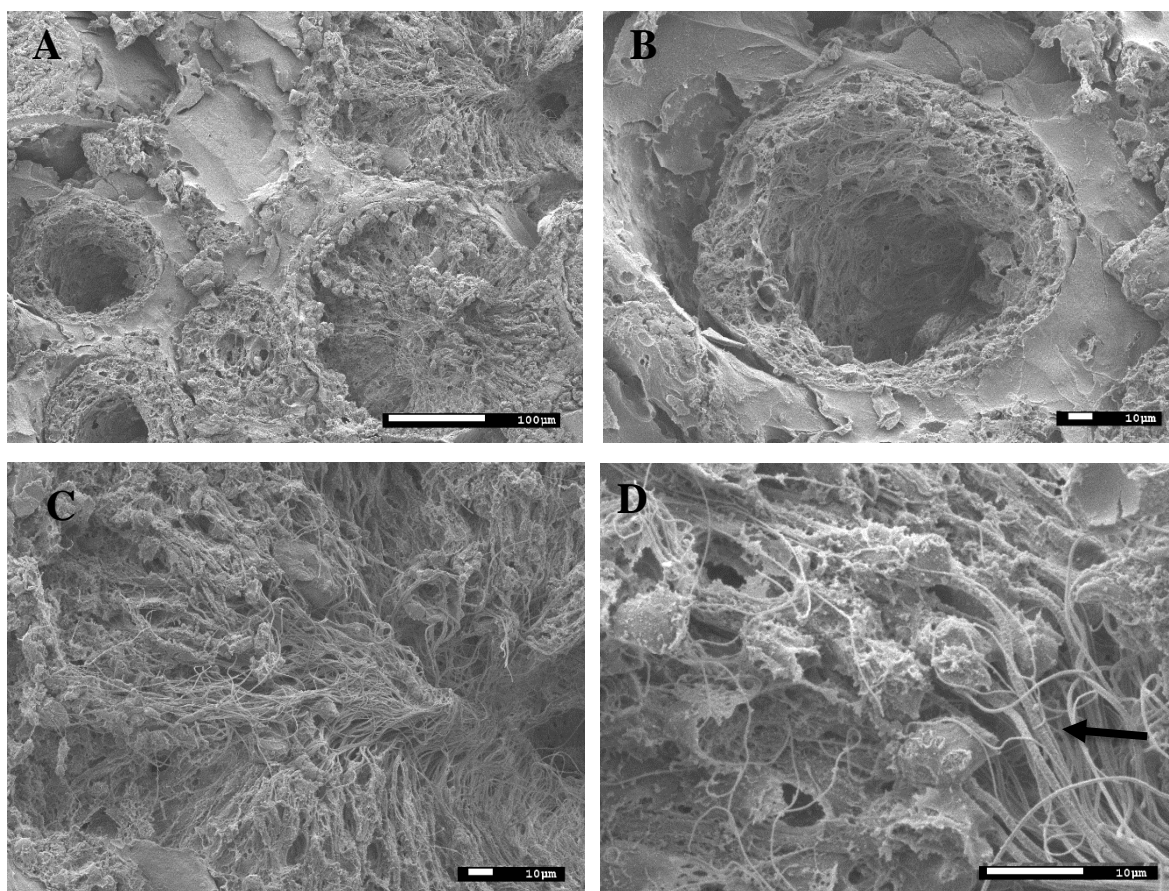


**Slika 27:** Mikrografije prikazujejo nekaj primerov onesnaženja na preparatu. Masivno onesnaženje z delci ki močno presegajo velikost semenčic (A, B) Onesnaženje ozadja z submikronskimi delci neznanega izvora (C). Delci neznanega izvora prilepljeni na posamezno semenčico (D).

#### 4.7 PRIPRAVA PREPARATOV NEFIKSIRANEGA TKIVA MODA PODGANE

Na dveh vzorcih nefiksiranega moda podgane smo preverili uporabnost metode priprave semenčic za VEM.

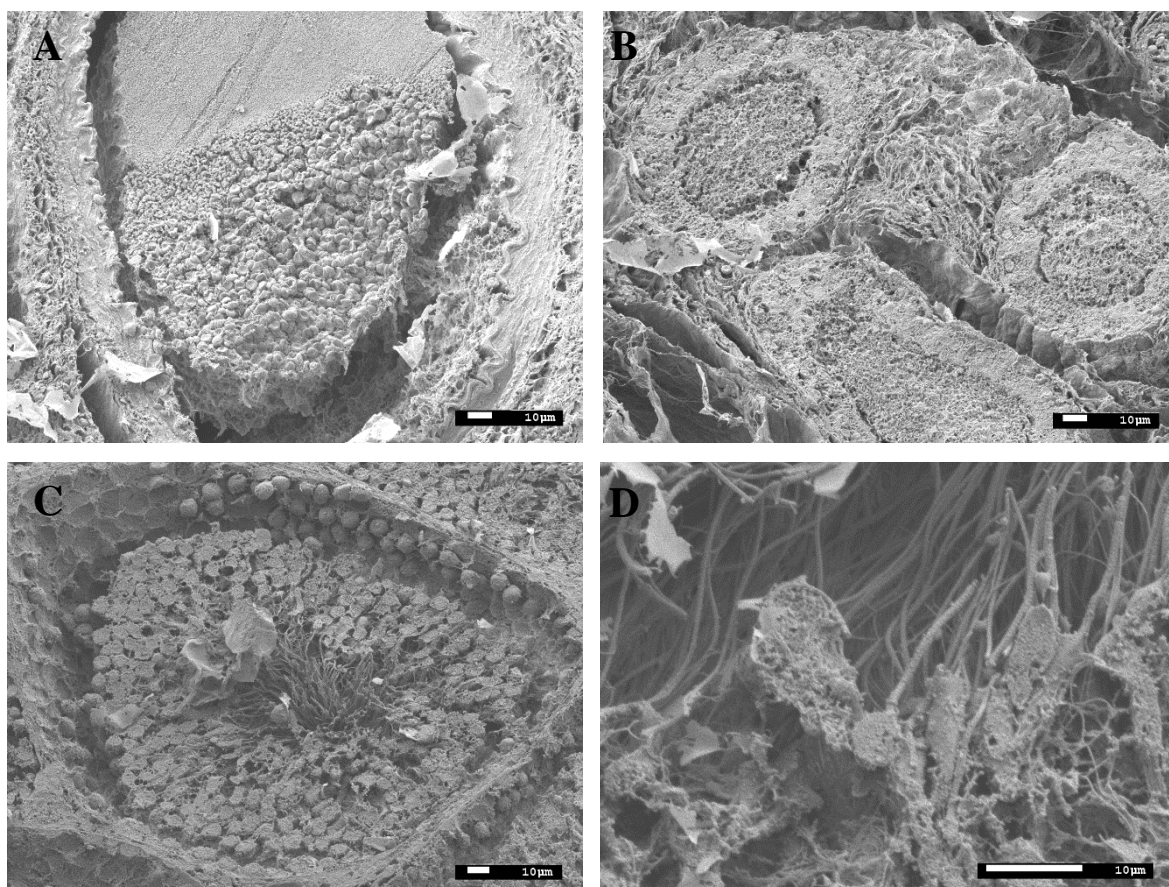
S postopkom dvostopenjske aldehidne in osmijske fiksacije ter sušenjem pri kritični točki, ki je standarden za pripravo svežih tkiv, smo dobili mikrografije, ki nam nudijo vpogled na semenske cevke in semenčice »*in situ*«. Če primerjamo kvaliteto fiksacije tkiva moda s semenčicami iz suspenzije, se izkaže, da so repi razvijajočih semenčic, ki gledajo v svetlino zvitih semenskih cevk in semenčice v svetlini, primerljivi (Slika 28). Sušenje bloka tkiva kaže določene pomanjkljivosti, na primer sesedanje semenskih cevk in odstopanje semenskega epitelija, kar bi bilo mogoče odpraviti s prilagoditvijo odvzema in razreza tkiva moda ter drugačno zasnovano dehidracije in sušenja.



**Slika 28:** Mikrografije tkiva moda podgane. Semenske cevke (A, B). Šop repov semenčic (C). Skupina semenčic, ki gledajo v svetlino zavrtih semenskih cevk (D, puščica).

#### 4.8 PRIPRAVA PREPARATOV IZ PARAFINSKIH REZIN

Priprava preparatov tkiva vložnega v parafinske bloke za pregled z VEM, je v literaturi malo opisana oziroma nekoliko pozabljena. Iz vzorcev arhivskega materiala smo izdelali 10 stopničastih serij rezin debeline 200  $\mu\text{m}$  ter izdelali 30 mikrografij. Kljub temu, da način fiksacije in nadaljnja obdelava tkiva ni bila prilagojena za VEM se je pokazalo, da je možno razpoznati žile, zvite semenske cevke z zarodnim epitelijem in razvijajočimi se semenčicami (Slika 29).



**Slika 29:** Mikrografije tkiva moda podgane pripravljenih iz parafinskih rezin. Prerez krvne žile napolnjene s celicami (A), semenske cevke (B), semenska cevka z razvijajočimi semenčicami (C), semenčice (D). Struktura tkiva in semenčic je zelo dobro ohranjena.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Naloga magistrskega dela je bila ugotoviti, če raziskava semenčic z vrstično elektronsko mikroskopijo lahko prispeva relevantne podatke za klinično diagnostiko. VEM omogoča preučevanje površinskih struktur z elektronsko ločljivostjo in veliko globinsko ostrino, ki omogoča novo prostorsko predstavo preiskovanega vzorca. Zaradi tega, smo nalogo zasnovali tako, da smo pripravili izbor metode priprave preparatov za VEM, ki bi bila dovolj enostavna, ponovljiva in uporabna pri nadstandardni analizi in oceni semena. Cilj priprave bioloških vzorcev za pregled z VEM je, da dobimo mikrografijo, ki odraža realno obliko opazovanega objekta.

Metode, ki se uporabljajo za pripravo preparatov za VEM izvirajo iz izkušenj in znanja klasične histologije. Specifične prilagoditvami za zahteve VEM in preiskovanih celic ter tkiv omogočajo pripravo širokega nabora bioloških vzorcev (Watson in sod.,1980). Za naše potrebe smo uporabili prilagojene fiksative z nižjo ozmolarnostjo. Želeli smo zagotoviti adekvatno sliko, zanesljivost in primerljivost rezultatov, da bodo protokoli uporabni za klinično prakso.

Preizkusili smo različne metode fiksacije, različne metode priprave stekelc z adhezivnimi sredstvi ter različne metode sušenja. Pomembno vlogo ima tudi optimizacija časa trajanja celotnega postopka v realnih časovnih okvirjih.

Pri ugotavljanju uporabnosti fiksacije za naše vzorce smo testirali preizkušeni (Rode, 1991) dvostopenjski postopek fiksacije živalskih tkiv. Kombinacija obeh agensov najbolje utrdi in ohrani strukturo tako glav, vratov in tudi repov. Aldehidni fiksativ stabilizira proteine, ki jih osmiranje še dodatno utrdi ter obenem stabilizira lipide. Spiranje, ki je potrebno zaradi sosledja različnih fiksativov lahko privede do izgubljanja vzorca.

Ker smo želeli fiksacijo poenostaviti, smo preverili tudi uporabnost enostopenjske fiksacije samo z osmijem ali samo z aldehidnim fiksativom. Kot pričakovano, je uporaba osmija

dala dobre rezultate fiksacije, medtem, ko se je fiksacija samo z aldehydним fiksativom izkazala za nezadovoljivo.

Priprava podlage, krovnih stekelc, je pomemben korak priprave vzorcev v suspenziji za VEM. Glede na pretekle izkušnje pri pripravi krvnih celic, kvasovk, gliv ipd., je nujna raba adhezivov. Preizkusili smo uporabo Alcian modrega, Poly-L-Lysina in Bind-Silana, ki omogočajo prilepljanje celic na podlago. Kot najbolj uporabna metoda priprave podlage se je izkazala priprava z Alcian modrim. Celice se lepijo v tankem sloju, ozadje je čisto, brez lastnih struktur, postopek priprave je enostaven in hiter. Za primerjavo preverjeni metodi (Pollak, 2003) smo stekelca tretirali s Poly-L-Lysinom in Silanom. Obdelane podlage enako dobro lepijo celice, vendar pa občasno dajejo nehomogeno ozadje. Ugotovili smo, da je pri tem ključen način nanosa adheziva in sušenja lepilne plasti. Predebel sloj oblije celice in jih utopi. Postopek je bolj zapleten, zato so napake pogostejše.

Postopek dehidracije smo sprva izvajali na krovnih stekelcih ter vzorce sušili pri kritični točki ali s HMDS. Sušenje pri kritični točki predstavlja najbolj zanesljivo metodo sušenja in omogoča posušitev s čim manjšimi deformacijami in artefakti. Preizkusili smo tudi sušenje na zraku s HMDS. Pri tem občasno prihaja do erozije površine celic. V postopkih priprave vzorcev v centrifugirkah in na membranskem filtru je zaradi tehničnih omejitev, sušenje s HMDS uspešen kompromis.

Po pregledu številnih preparatov, na katere je bil nanesen vzorec, pripravljen po enakemu postopku fiksacije, spiranja, dehidracije, priprave krovnih stekelc in sušenja, smo ugotovili, da se celice lahko učinkovito prilepijo. V nekaj primerih pa iz nepojasnjenih razlogov do prilepljanja ni prišlo. Predvidevali smo, da se je vzorec odlepil in odplaval med spiranjem, dehidracijo ali sušenjem pri kritični točki. V kritičnih primerih je lahko izguba vzorca usodna.

Protokol smo prilagodili tako, da smo dehidracijo in inkubacijo s HMDS izvedli v centrifugirkah. Koncentriranja s centrifugiranjem in ponovnim dispergiranjem povzročajo izgube in poškodbe vzorca. Vzorec smo nanegli na krovna stekelca šele v fazi sušenja.

Tudi pri tem postopku je prihajalo občasno in naključno do odplavljanja celic in izgubljanja vzorca. Tak protokol priprave preparatov zato za klinično prakso ni primeren.

Kot rešitev omenjenih problemov smo preizkusili metodo z membranskim filtrom. Z nanašanjem vzorca v lijak nad membranskim filtrom smo med dehidracijo in sušenjem s HMDS ohranili celoten vzorec. Metoda se je izkazala kot najboljša, zlasti je nepogrešljiva v primerih, ko je volumen vzorca majhen, z majhnim številom semenčic.

Pri vrednotenju rezultatov preverjanja uspešnosti posameznih protokolov priprave preparatov smo naleteli na resno praktično in teoretično vprašanje. Vzorci, ki smo jih dobili v preiskavo so bili zelo različni, bili so vzorci različnih dajalcev, ki so bili v večini vključeni v zdravljenje moške neplodnosti. Pred prevzemom materiala so šli vzorci skozi rutinske postopke obdelave v Androloškem laboratoriju. Ta postopek priprave vzorcev v osnovi ni bil namenjen za pripravljane preparatov za VEM. Zato je težko oceniti, kaj je napaka, ki nastane pri postopku in kaj so individualne napake, pogojene genetsko in s fiziološki procesi.

Želeli smo preizkusiti, če protokol dvostopenjske fiksacije in sušenja pri kritični točki lahko uporabimo za pripravo tkiva v modu in razvijajočih semenčic, kar bi lahko služilo kot potencialna metoda za preverjanja strukture razvijajočih se semenčic v modu.

Preizkusili smo postopek priprave preparatov za VEM iz parafinskih blokov uporabljenih v rutinski histološki praksi. Ugotovili smo, da je mogoče s pomočjo VEM dobiti uvid v strukturo in razporeditev razvijajočih se semenčic v modu iz parafinskih blokov. Tudi to metodo bi bilo mogoče z prilagajanjem parametrov priprave vzorca in izdelave preparata optimalno pripraviti za VEM, za kar pa bi bil potreben daljši čas.

Vendar smo se iz praktičnih razlogov posvetili predvsem preiskavi semena, ker se je izkazalo, da je bila izdelava protokola priprave preparatov semena pomembna za aktualno diagnostiko.



## 5.2 SKLEPI

Ugotovili smo, da je preizkušena dvostopenjska fiksacija z aldehidi in osmijem optimalen način fiksacije tudi za semenčice. Ravno tako smo ugotovili, da pri poenostavitvi postopka fiksacije samo z osmijem, ta relativno dobro ohrani obliko celic. Ugotovili smo, da se je fiksacija samo z aldehidi izkazala za neprimerno.

Pri vzorcih, ki so namenjeni samo za pregled površine semenčic smo ugotovili, da je najbolj primeren protokol priprave preparatov z dvostopenjsko fiksacijo, lepljenje celic na krovna stekelca prekrita z Alcian modrim in sušenje pri kritični točki.

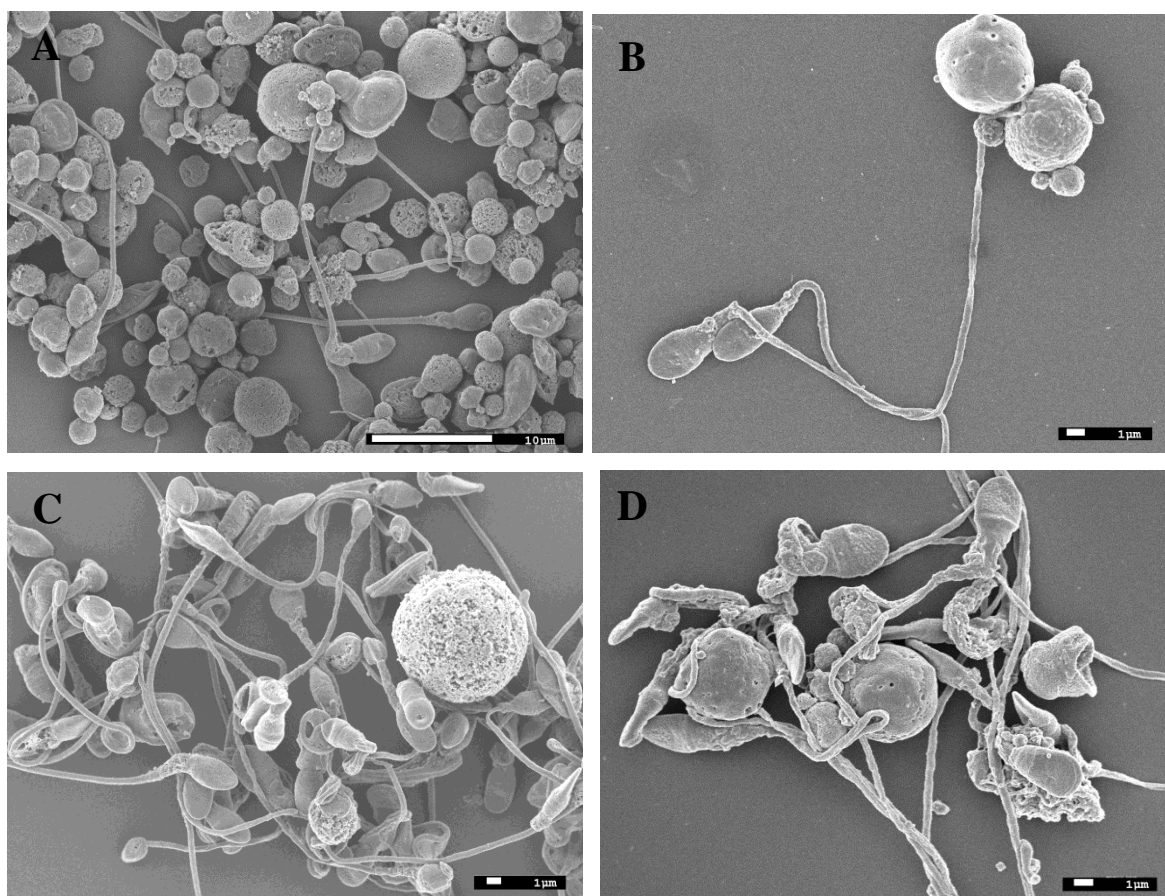
V skladu s pričakovanji, smo ugotovili, da sušenje pri kritični točki (CPD) najmanj poškoduje tkiva in celice. V primerih, kjer zaradi načina priprave vzorca na membranskem filtru postopka CPD nismo mogli uporabiti, smo ugotovili, da je sušenje s HMDS idealen kompromis.

## 5.3 NADALJNE DELO

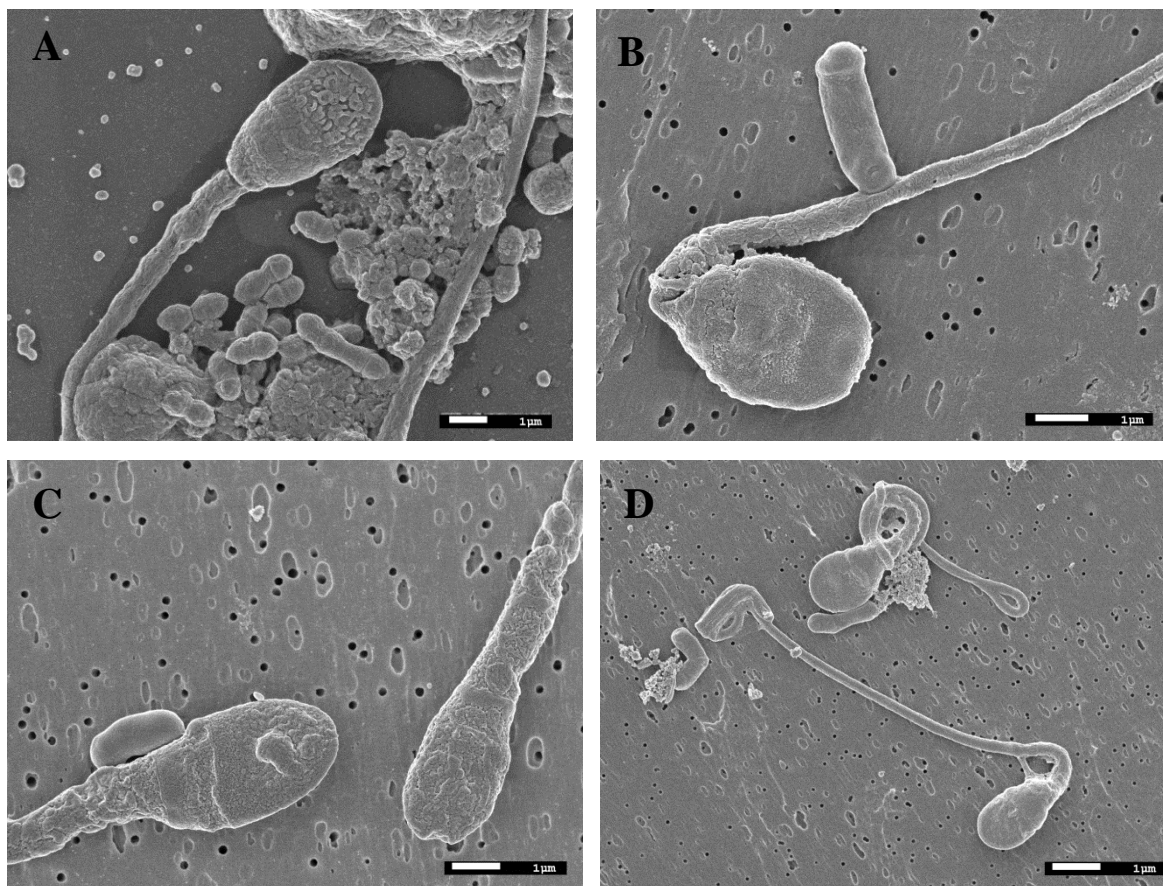
Vrstična elektronska mikroskopija je odprla nov pogled pri spoznavanju površinskih struktur semenčic. Slika pove več kot tisoč besed, zato na ogled in v premislek namesto obsežnega teksta predstavljamo izbor slik, ki so nastale pri našem delu. Na začetku velja opozorilo. Vsi vzorci, ki smo jih sprejeli v obdelavo v predstavljenem magistrskem delu prihajajo iz Androloškega laboratorija in so vzorci semena moških, ki so bili v postopku zdravljenja ali preverjanja oploditvene sposobnosti. Zaradi tega so odstopanja v sestavi vzorca in specifičnih oblikah semenčic pričakovano drugačna kot nasploh pri moški populaciji. Analiza predstavljenih slik, razlaga odstopanj od značilne, učbeniške oblike semenčice, ugotavljanje oploditvene sposobnosti in razmejitev med normalno in nenormalno obliko celic, presega koncept in obseg predložene magistrske naloge in predstavlja izziv za prihodnost.

### 5.3.1 Druge celice in bakterije v vzorcu

Na preparatih pogosto vidimo prisotnost drugih celic ali celičnih elementov (Slika 30). Skoraj mimogrede na VEM mikrografijah s prikazom npr. bakterij, levkocitov itd., dobimo vzporedno še namig na potencialne okužbe, kar vpliva oziroma odraža kvaliteto semena (Slika 31).



**Slika 30:** Na preparatih pogosto vidimo prisotnost drugih celic ali delov celic. Mikrografije prikazujejo pojavnost, raznolikost in velikost teh elementov pri štirih različnih preparatih (A, B, C, D).



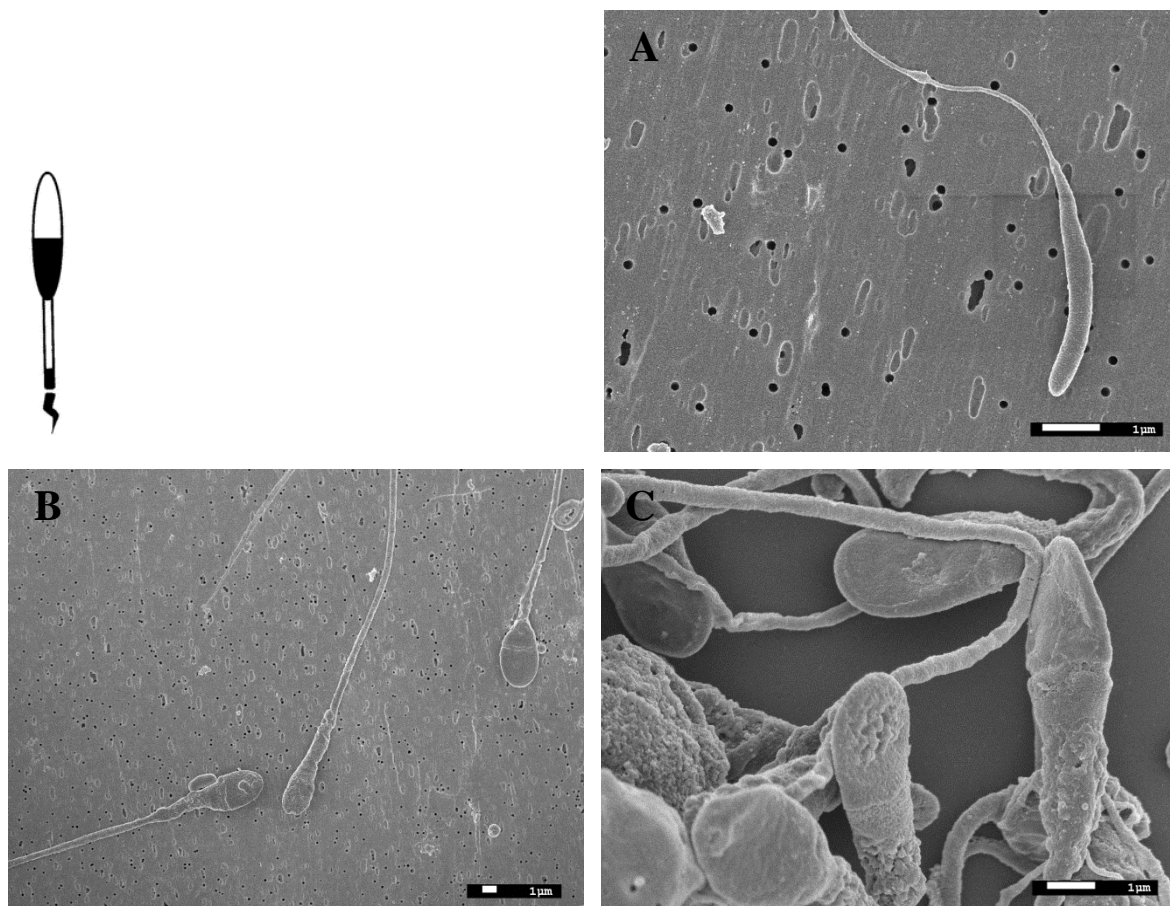
**Slika 31:** Mikrografije prikazujejo gruče bakterij (A) ali posamezne bakterije (B, C, D) na preparatu.

### 5.3.2 Napake glave semenčice

V literaturi so opisane kategorije, sheme in poimenovanja najpogostejših morfoloških napak na glavi, vratu in repu semenčic (Zorn, 2014). Pri našem delu smo dobili vrsto slik, ki zaradi večje ločljivosti mikroskopa pokažejo več podrobnosti in dajejo boljši vpogled v strukturo površine semenčic. Shemam poskušamo z mikrografijami postaviti vzporednice, ki bi lahko postale pomembne pri presoji strukturnih in funkcionalnih lastnosti semenčic.

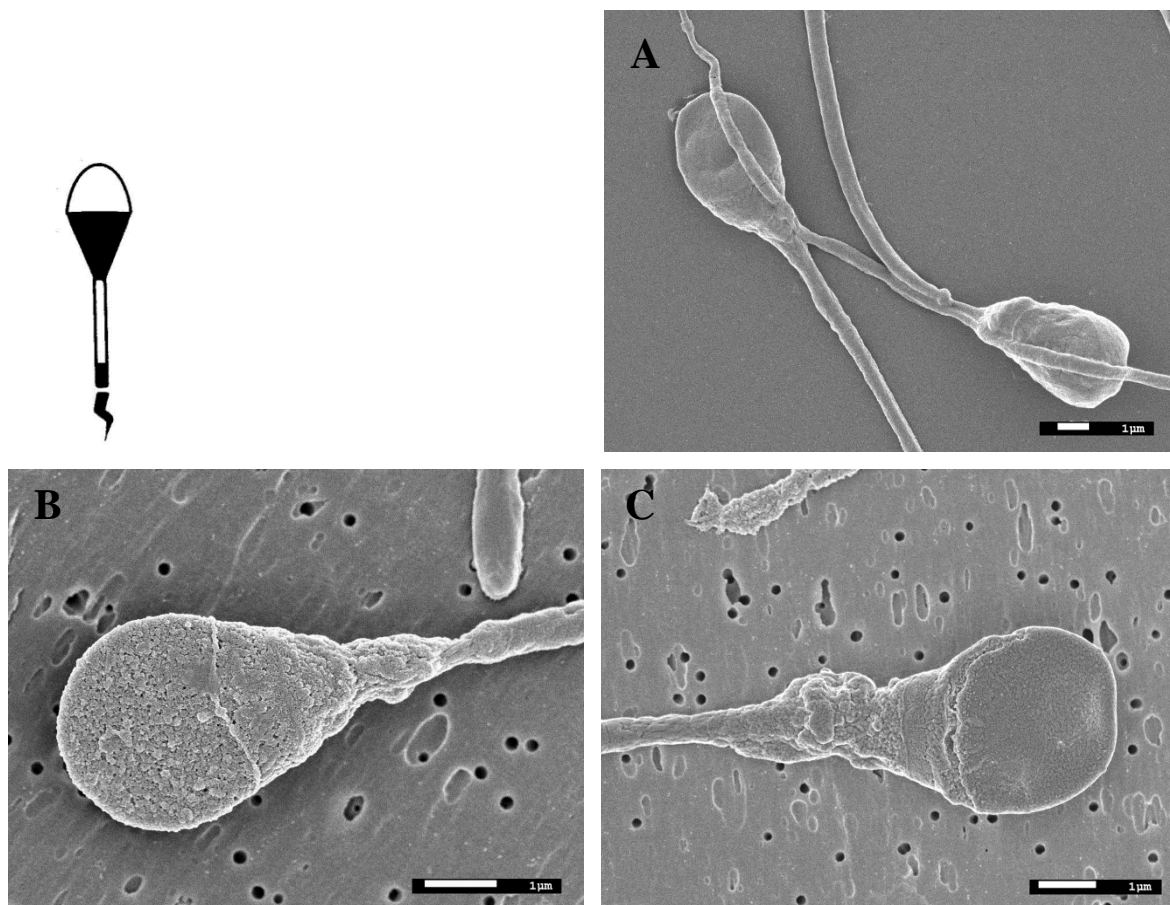
Na mikrografijah prepoznamo podolgovato glavo (Slika 32), glavo hruškaste oblike (Slika 33), glavo z akrosomom z zmanjšano površino (Slika 34), okroglo glavo ali glavo brez akrosoma (35), amorfne semenčice (Slika 36), glavo z vakuolami oziroma površinskimi deformacijami (Slika 37).

- Podolgovata glava:



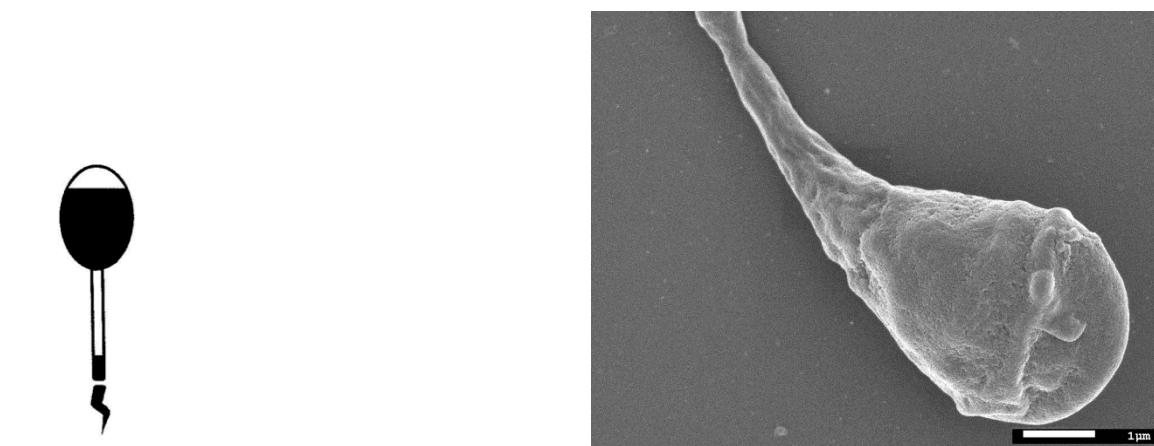
**Slika 32:** Semenčice s podolgovato glavo (A, B, C).

- Glava hruškaste oblike



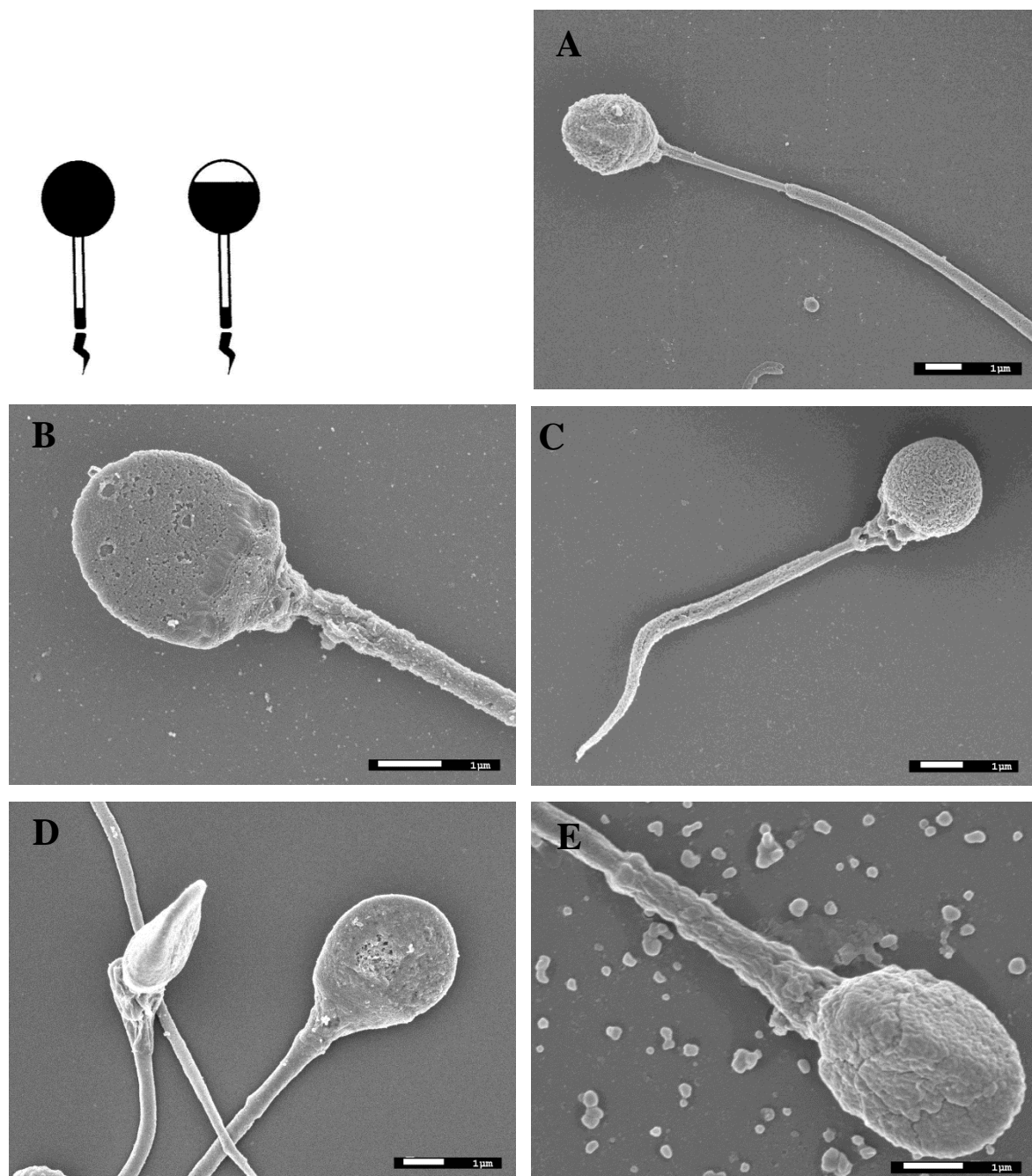
**Slika 33:** Semeničice s hruškasto obliko glave (A, B, C).

- Glava z majhno površino akrosoma



**Slika 34:** Semeničica z majhno površino akrosoma.

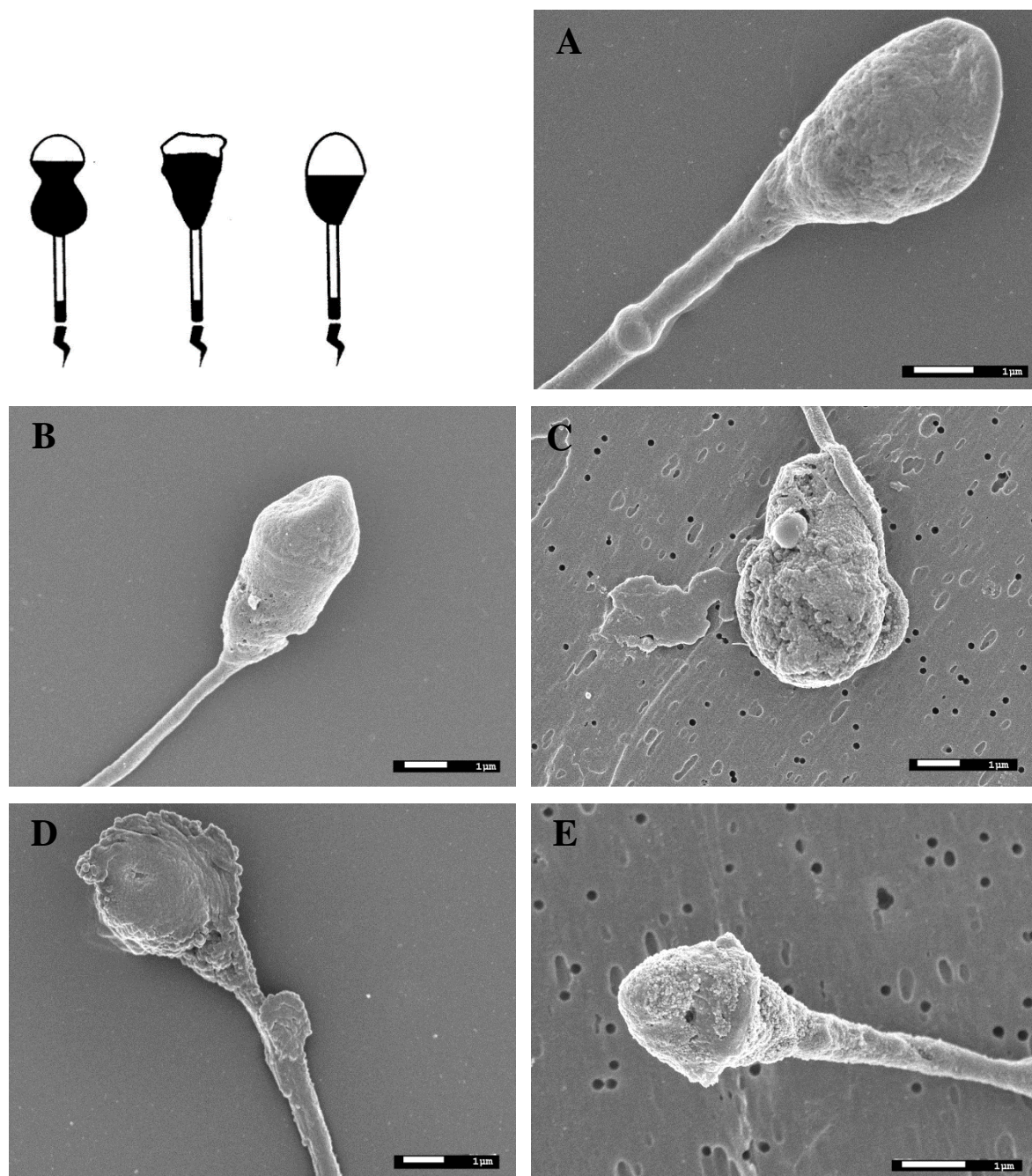
- Okrogla glava ali glava brez akrosoma



Slika 35: Semenčice z okroglimi glavami in glavami brez akrosoma (A-E).



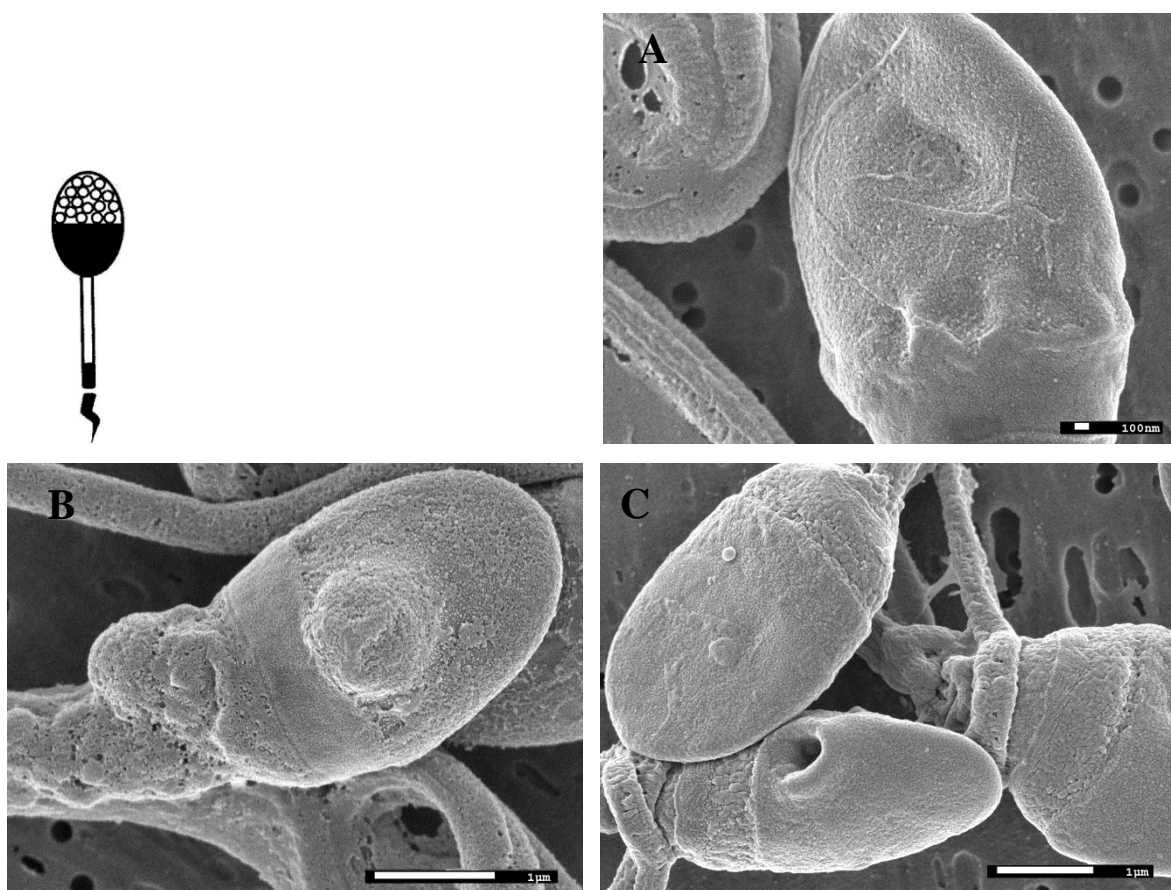
- Amorfnе semenčice



**Slika 36:** Semenčice. Deformacije na površini glave so lahko zelo raznolike (A-I).

- Glave s površinskimi deformacijami (vakuolami)

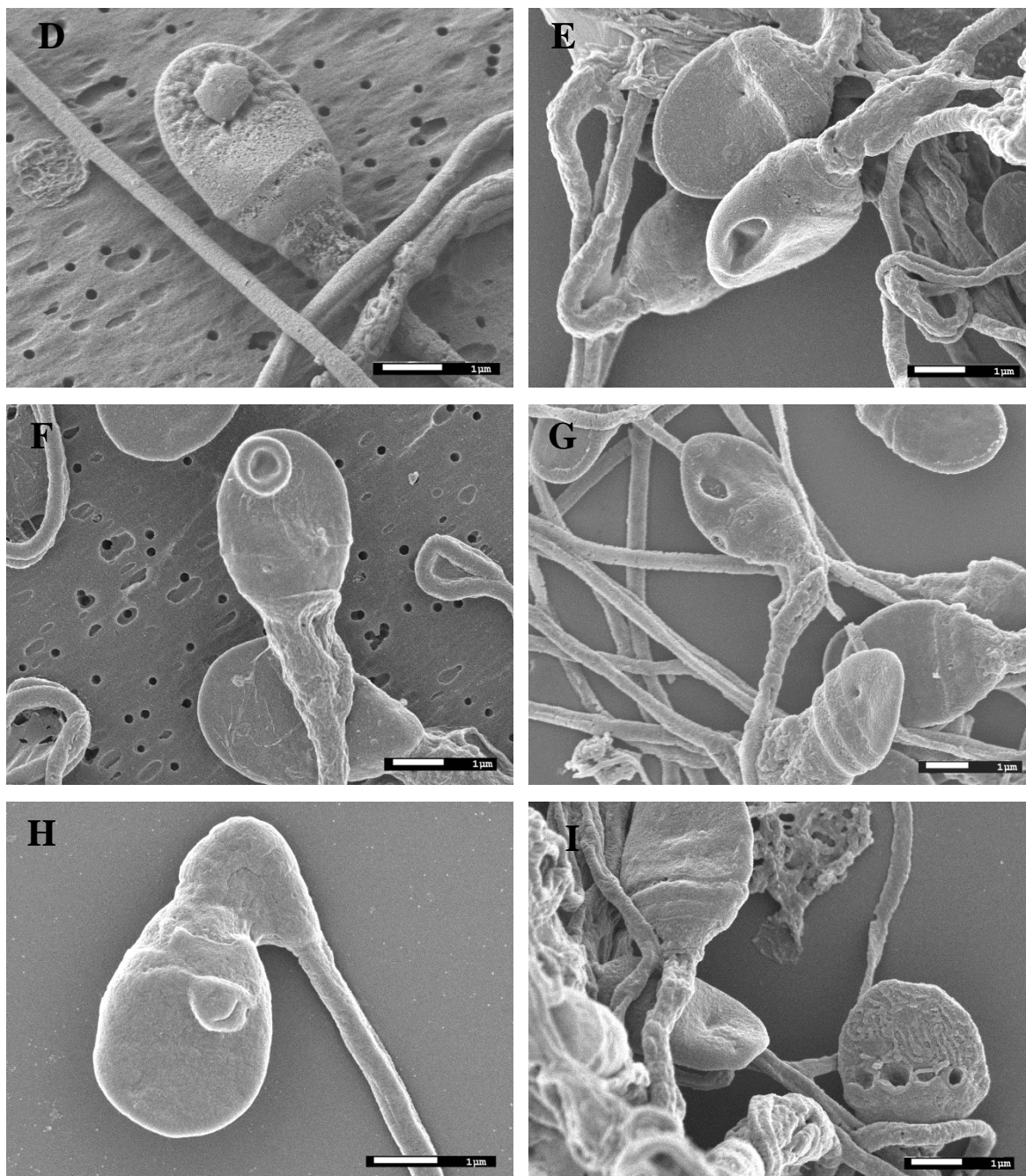
Vprašanje vakuol v glavi semenčice je trenutno aktualno. Na naših mikrografijah smo pogosto, pri zelo različnih preparatih, opazali številne neobičajne deformacije na površini glave semenčic. Te se kažejo kot raznovrstne in različno oblikovane izbokline ter večje ali manjše ugreznitve površine. Ker z VEM praviloma opazujemo površinske strukture celic, celičnih vključkov ne moremo videti. Zato težko neposredno postavljamo vzporednice strukturam, ki jih opazajo pri svetlobni in transmisijski elektronski mikroskopiji. V tej stopnji naše raziskave vprašanje vakuol ostaja do nadaljnjega odprto (Slika 37).



**Slika 37:** Niz mikrografij semenčic kaže kako velika je pestrost oblik - deformacij na površini glave. Vidne so izbokline in ugreznitve (A-I). Slika se nadaljuje.



Nadaljevanje Slike 37.

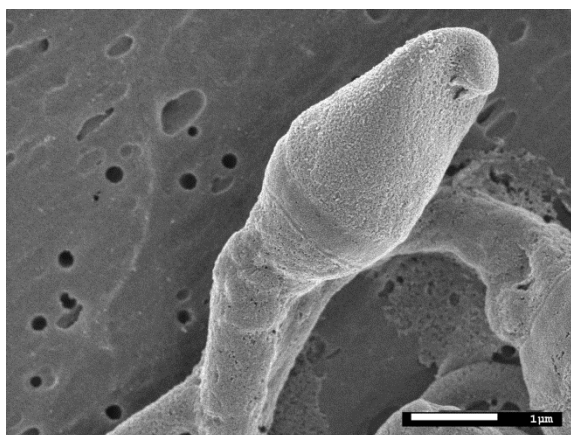


**Slika 37:** Prikazane strukture na glavi semenčic bi lahko ustrezale vakuolam, ki so očitne pri TEM.

### 5.3.3 Morfološke napake vratu

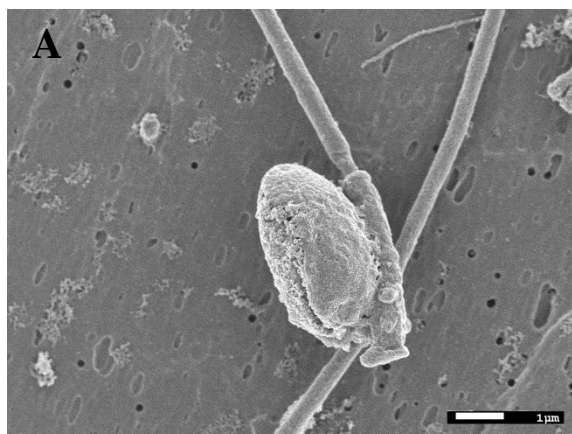
Na vratu in v srednjem delu repa semenčice se pojavljajo napake kot so: asimetrično nastavljen vrat (Slika 38), upognjen vrat (Slika 39), vrat z zadebeljenim stikom (Slika 40) in vrat s tankim stikom (Slika 41) (Zorn, 2014).

- Asimetrično vstavljen vrat



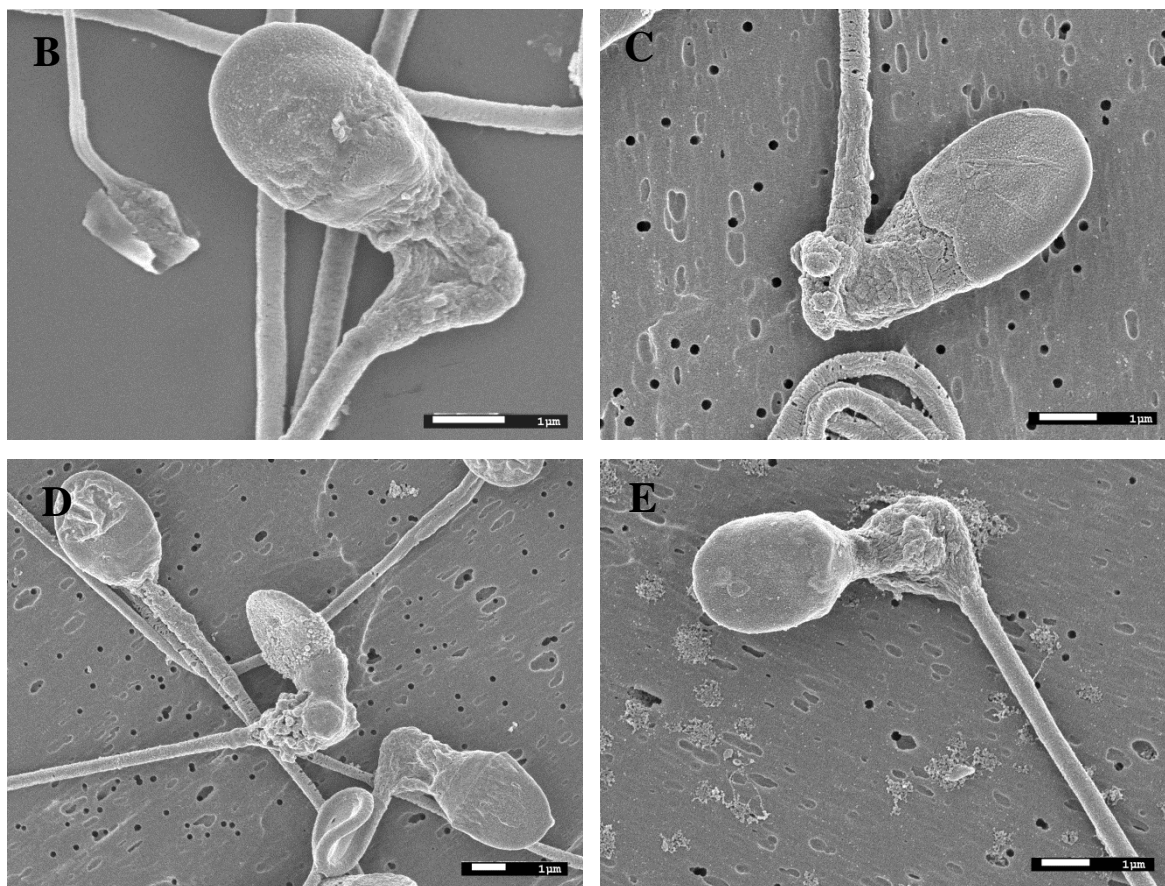
**Slika 38:** Semenčica z asimetrično vstavljenim vratom

- Upognjen vrat



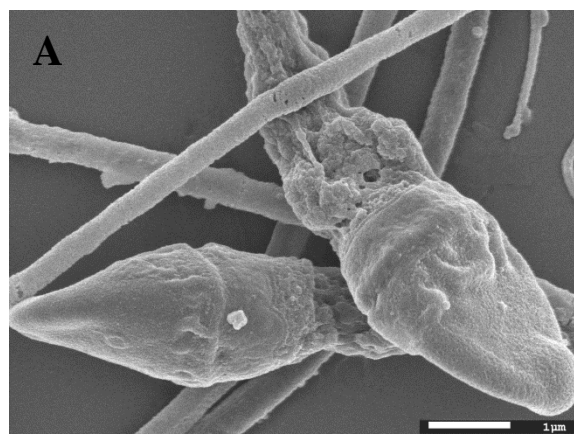
**Slika 39:** Semenčica z upognjenim vratom (A). Slika se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike 39.



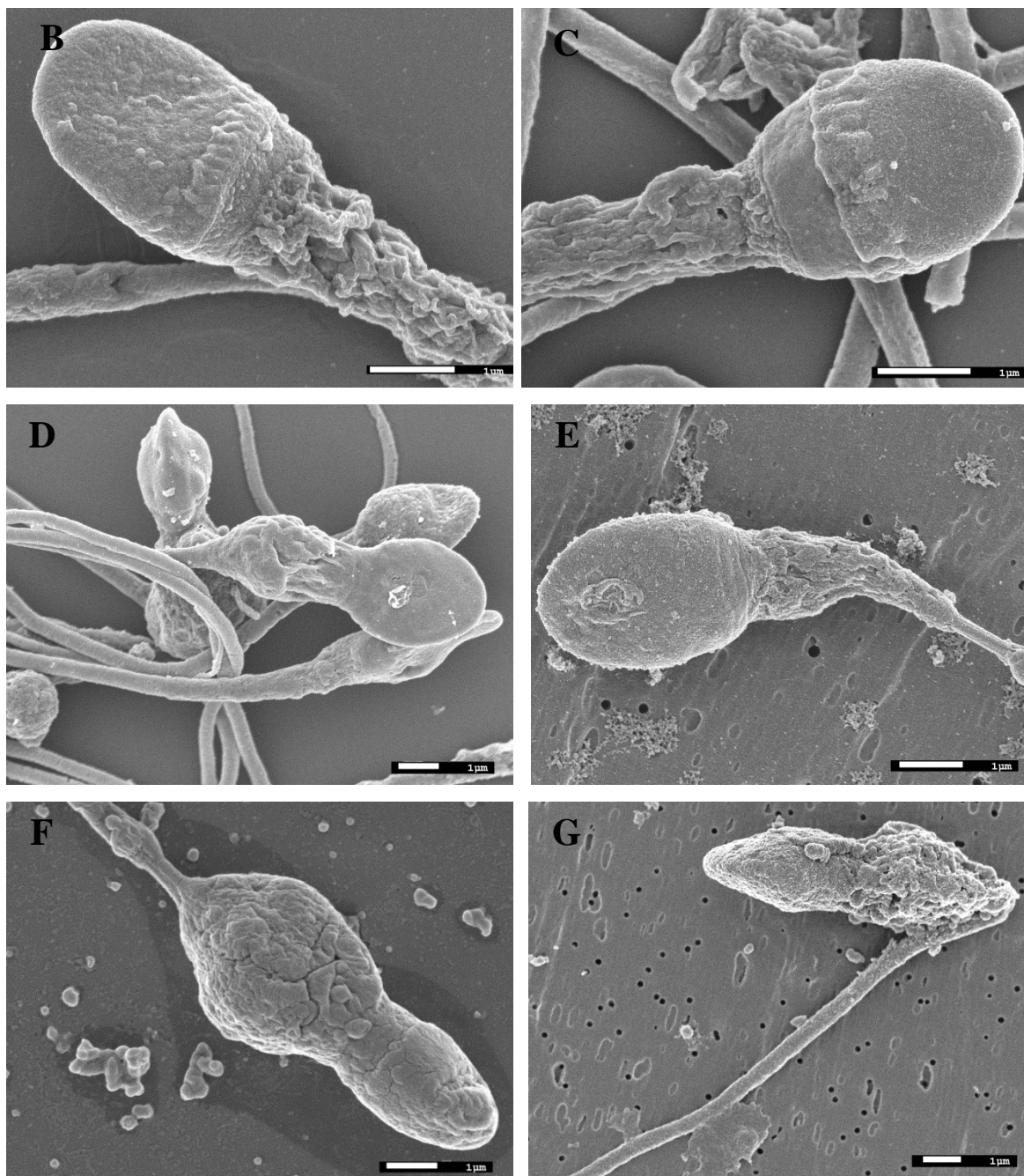
**Slika 39:** Semenčice z upognjenimi vratovi (B-E).

- Vrat z odebeljenim stikom



**Slika 40:** Semenčice z odebeljenim stikom. Slika se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike 40.

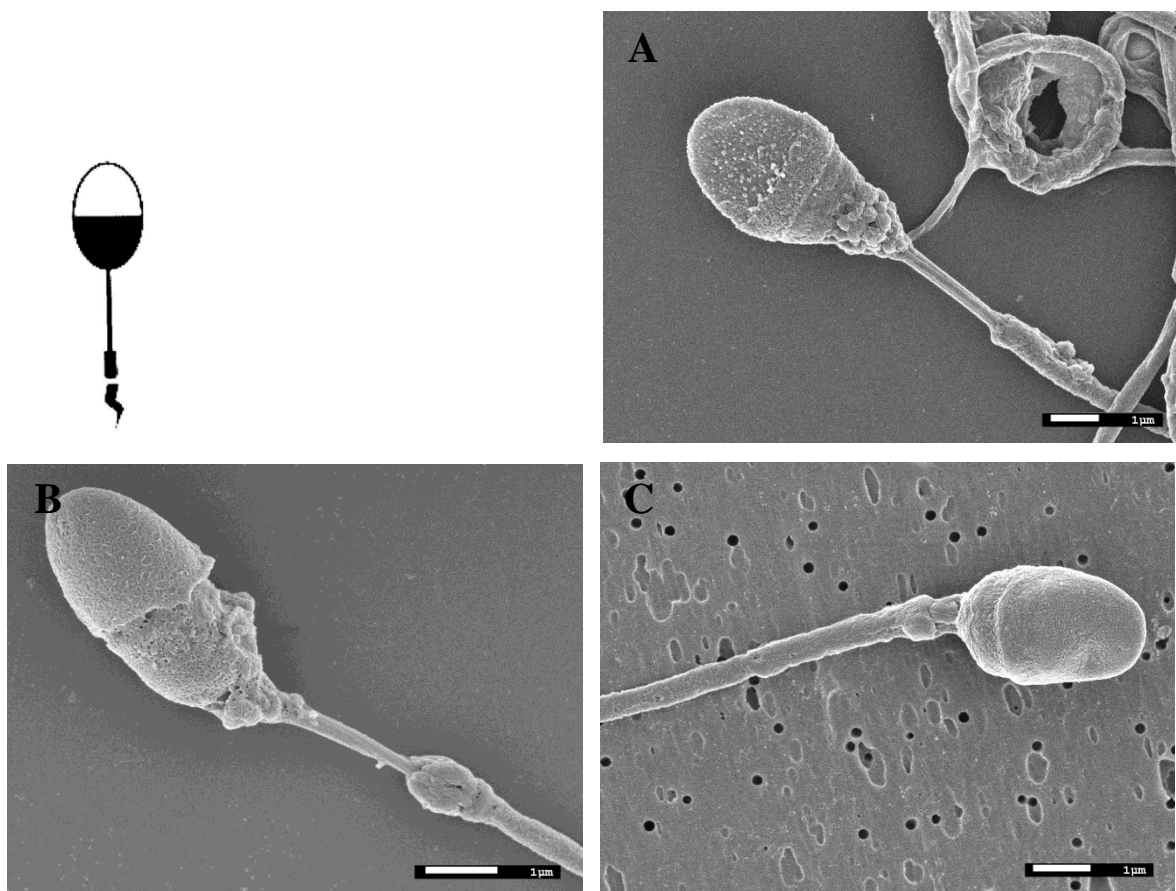


**Slika 40:** Pri nekaterih preparatih je vrat z odebeljenim stikom značilen pojav (A-D). Pri nekaterih semenčicah se na prehodu v rep pojavljajo zožitve in ogulitve (E). Močno spremenjeni vratovi semenčic (F, G).



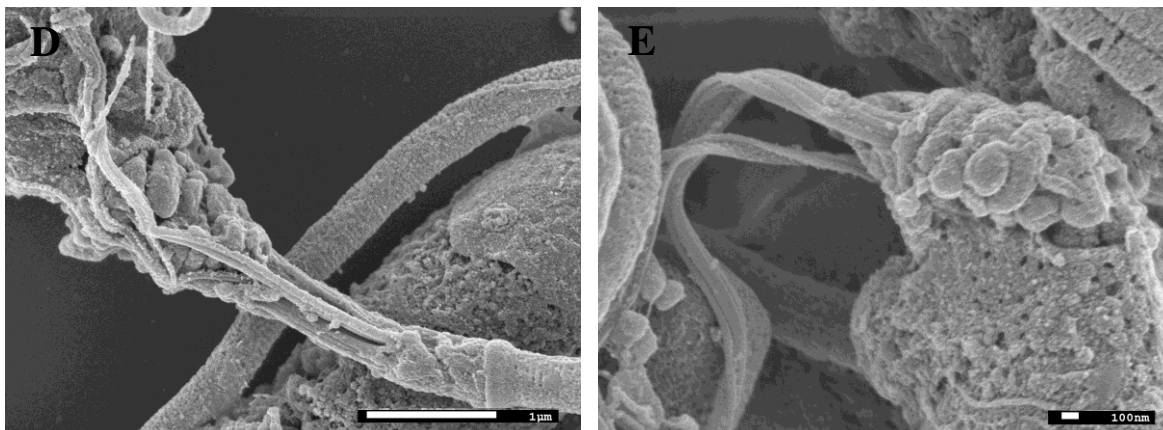
- Vrat s tankim stikom

Mikrografije semenčic s tankim stikom kažejo precejšno raznolikost, kar odpira vrsto funkcionalnih vprašanj. Vrat in srednji del repa je lahko samo stanjššan, celična membrana izgine in razkrije snop golih miofibril in mitohondrije. Na stanjššanem delu se zmanjša število mitohondrijev, kar je verjeten vzrok za slabšo mobilnost ali celo nezmožnost gibanja semenčice (Slika 41).



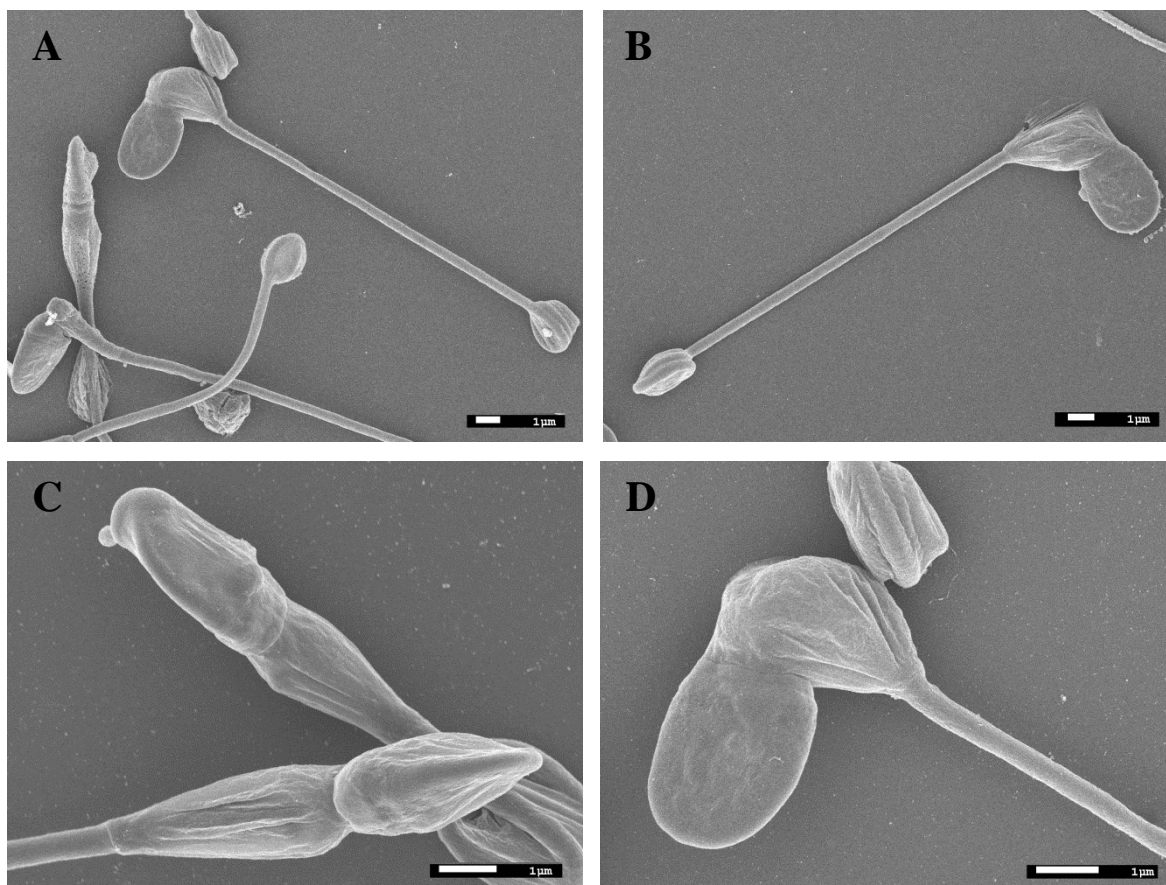
**Slika 41:** Semenčice s stanjšanim stikom (A, B). Opazni posamezni mitohondriji (C). Slika se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike 41.



**Slika 41:** Semenčici z razkritima vratovoma in srednjim delom repa ter posamezne miofibrile (D, E).

- Ostali defekti vratu

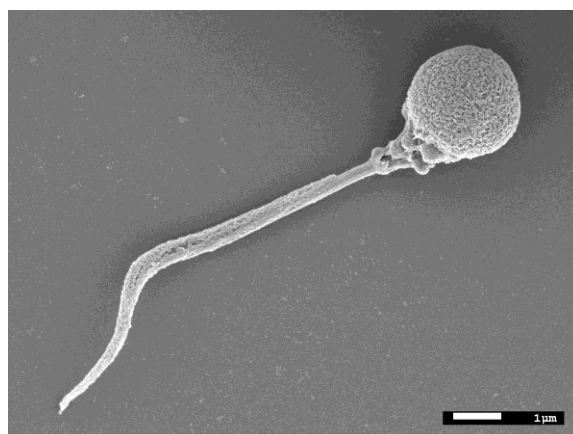


**Slika 42:** Semenčice z nenormalnimi vratovi (A-D).

### 5.3.4. Morfološke napake repa

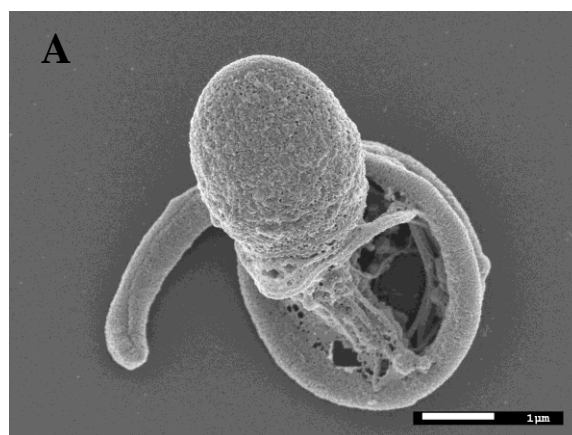
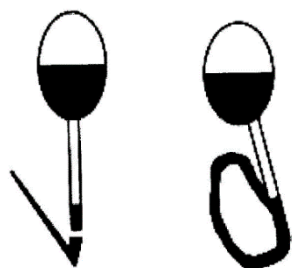
Pogoste morfološke napake na repu semenčice so kratek (Slika 43), upognjen in zvit glavni del repa (Slika 44).

- Kratek glavni del repa



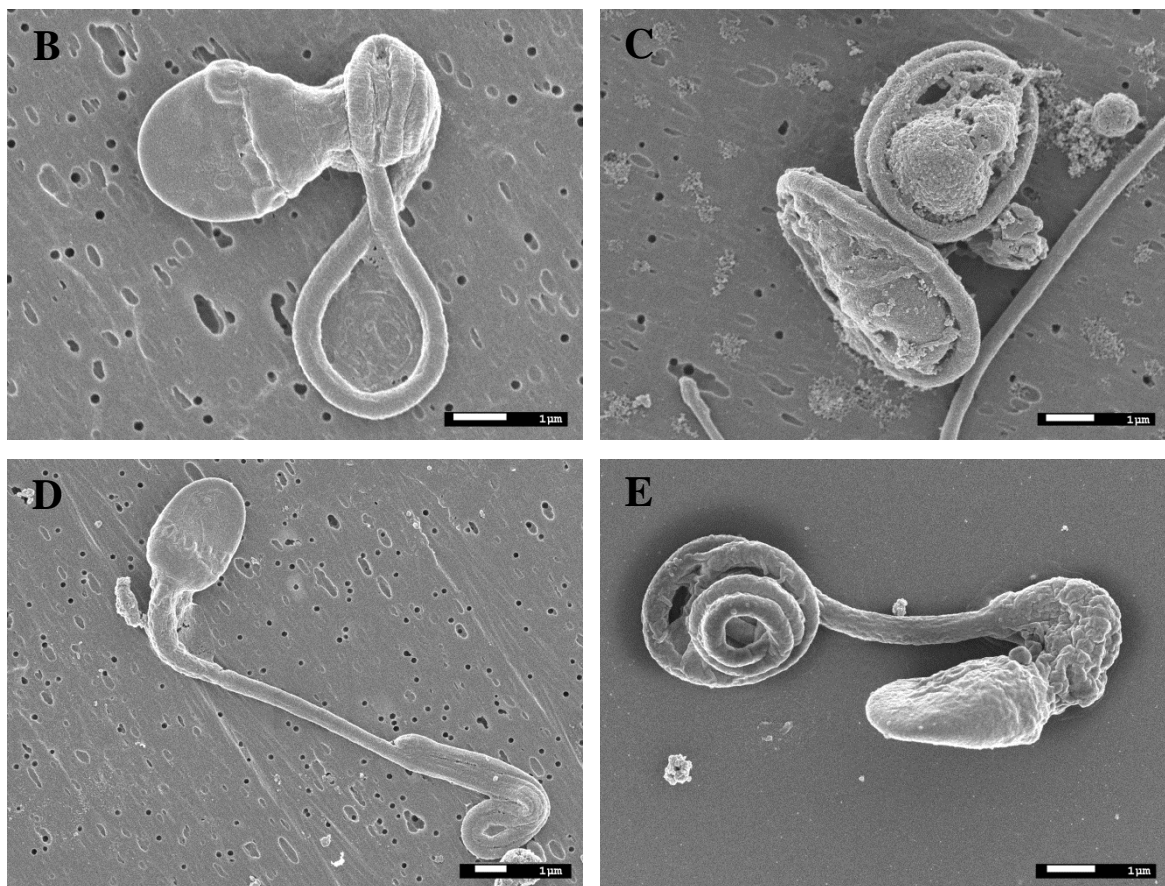
**Slika 43:** Semenčica s kratkim repom.

- Upognjen in zvit rep



**Slika 44:** Semenčica z zvitim repom (A). Slika se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike 44.

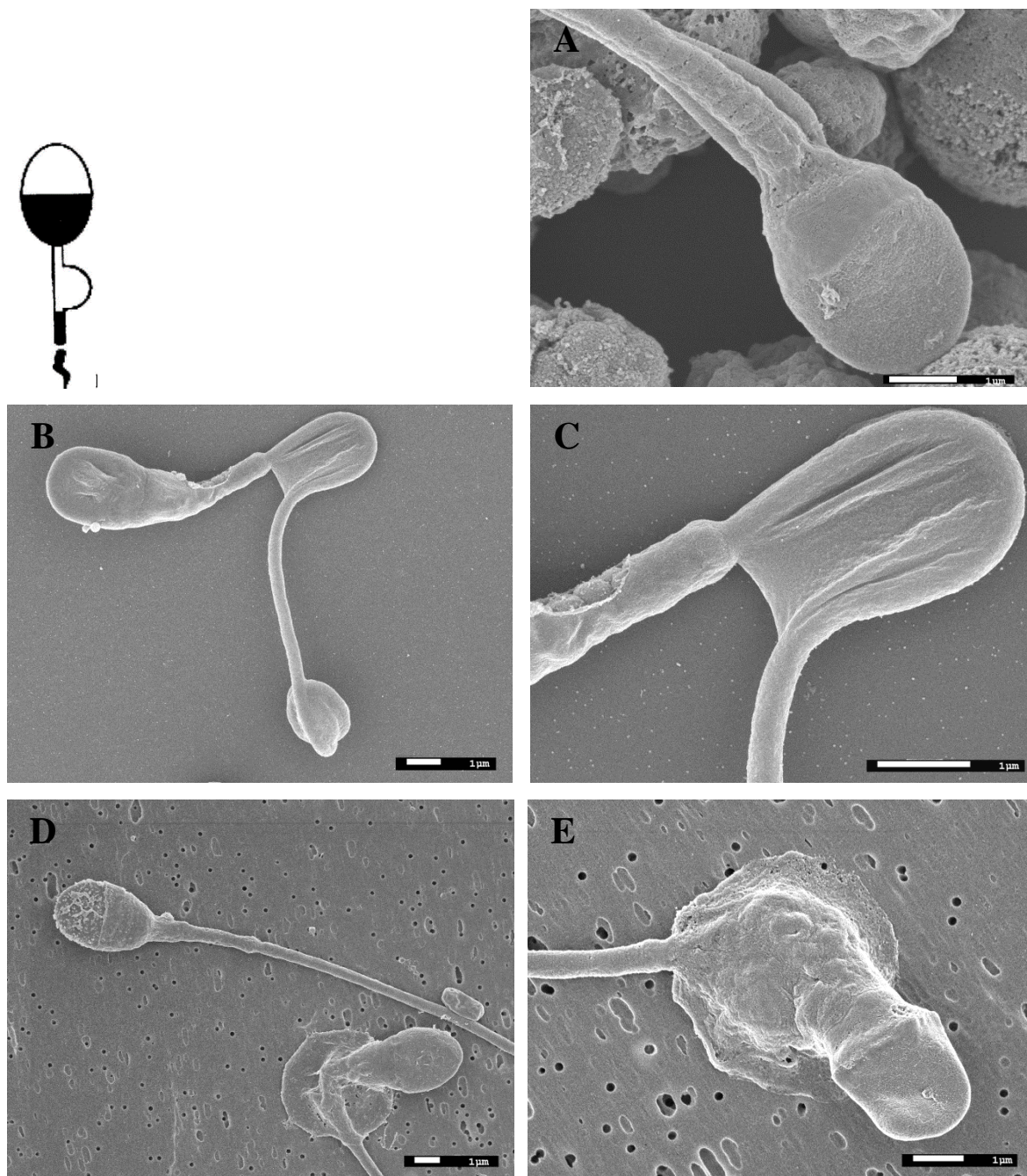


**Slika 44:** Semenčice z upognjenim ali zvitim repom (B-E).



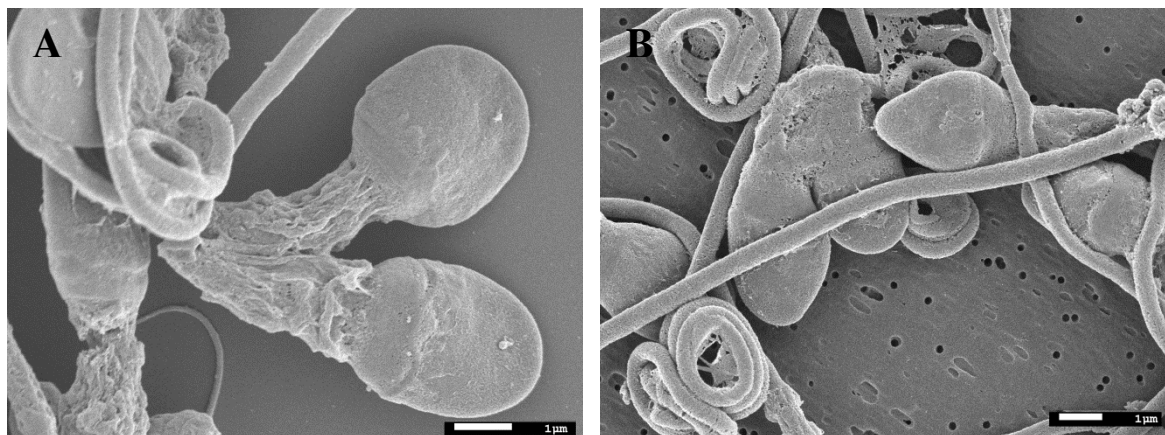
### 5.3.5 Semenčice z odvečno rezidualno citoplazmo

Nekatere semenčice nosijo v srednjem delu ostanek citoplazme, kar kaže na nenormalno oziroma nepopolno spermatogenezo in je značilnost nezrelih semenčic (Slika 45).



**Slika 45:** Semenčice z odvečno rezidualno citoplazmo. Ta se lahko pojavlja v delu vratu in srednjega dela repa (A, D, E) ali v glavnem delu repa (B, C).

### 5.3.6 Druge morfološke nepravilnosti semenčic



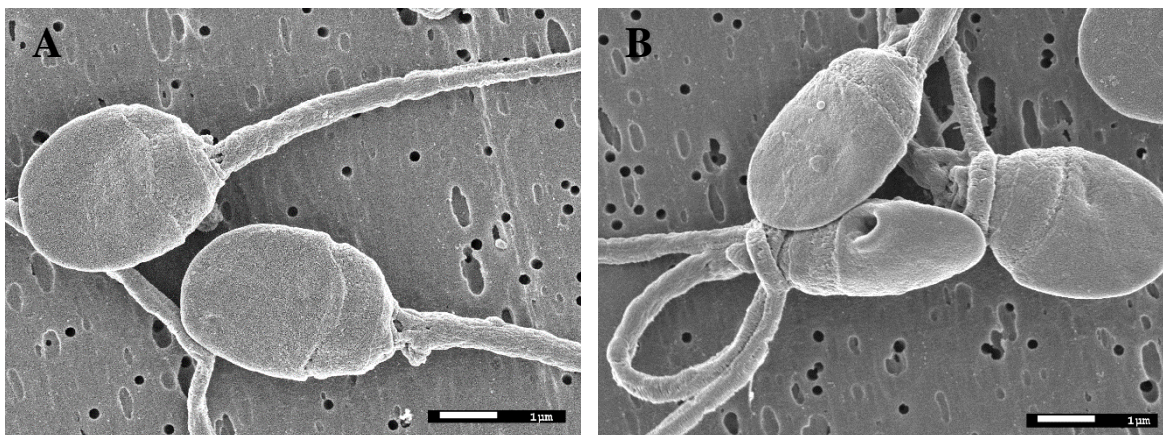
**Slika 46:** Mikrografiji prikazujeta dvoglavni semenčici. Slika A kaže združitev v delu repa. Slika B prikazuje združitev v delu glave in vratu.

## 5.4 UPORABNOST VEM V KLINIČNI PRAKSI

Potrdimo lahko predpostavko, da je VEM uporabna in koristna v klinični praksi. Že predhodni poskusi so nakazovali, da v nekaterih primerih temeljne mikroskopske analize semena skrivajo napake, ki na VEM mikrografijah postanejo očitne. Pri našem delu smo, obravnavali 3 moške iz neplodnih parov, evaluirane z normalno kakovostjo semenčic po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, 2010), ki so bili vključeni v postopek diagnosticiranja. Nasprotno pa so mikrografije (slika 47, 48 in 49) pokazale številna odstopanja, ki jih s standardno mikroskopsko analizo ni bilo mogoče opaziti. Metoda pokaže uporabnost, ne samo za potrditev, temveč tudi za popravo napačno postavljene diagnoze. Pri takšnih vzorcih priporočamo še nadaljne preiskave kot so npr. določanje stopnje fragmentacije in membranskega mitohondijskega potenciala.

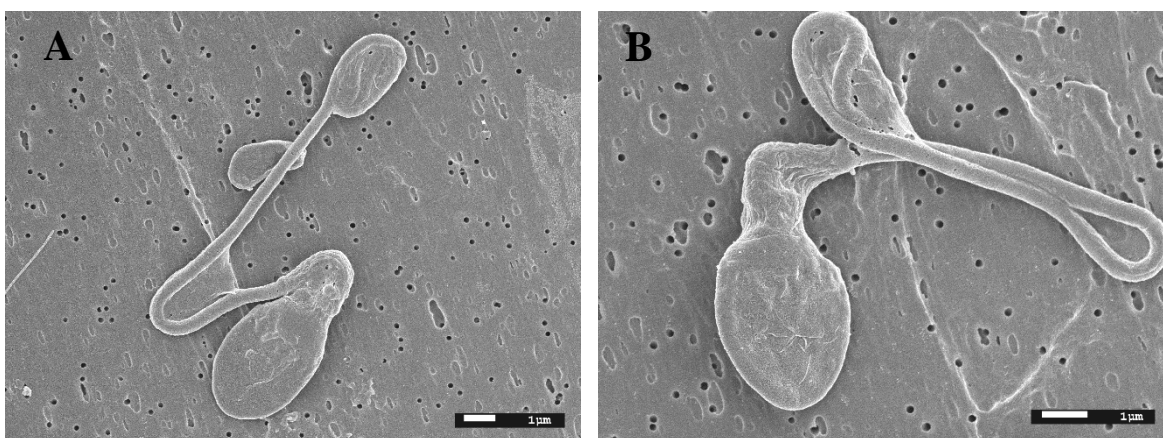


Primer št.1:



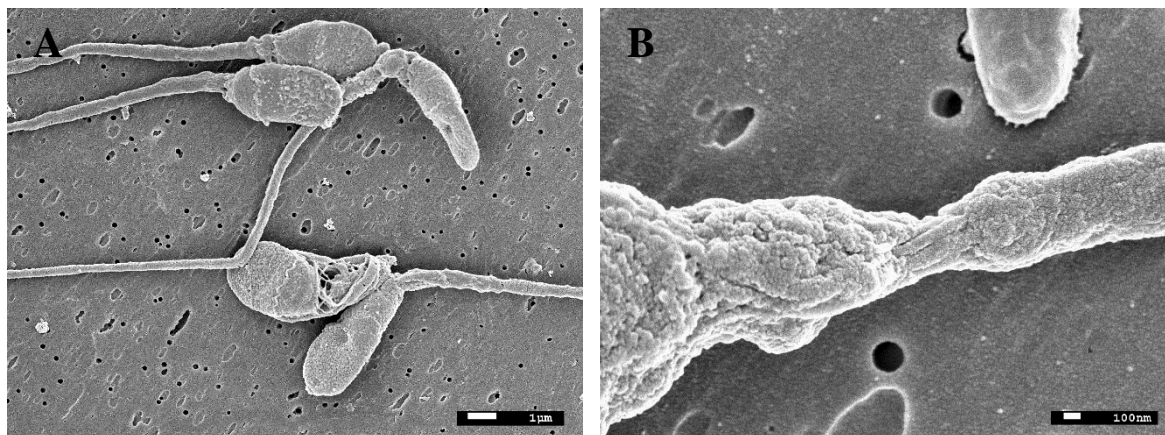
**Slika 47:** Mikrografiji semenčic kažejo močno stanjššan srednji del repa in odsotnost mitohondrijev (A). Opazni so številni citoplazmatski ostanki in deformacije glave (B).

Primer št.2:



**Slika 48:** Mikrografiji semenčic s citoplazmatskimi ostanki, deformacije vratu in srednjega dela repa ter zaviti in upognjen rep (A, B).

Primer št.3:



**Slika 49:** Mikrografiji semenčic kažejo stanjšani srednji del repa z odsotnostjo ali zmanjšanjem števila mitohondrijev, ogulitvijo in razkritjem miofibril srednjega dela repa, številne citoplazmatske ostanke in amorfnе glave (A, B).

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Kakovost in ocenjevanje semena ter s tem povezane sposobnosti moške plodnosti je zasidrana v klasični ocenitvi parametrov kakovosti semena. Temeljna analiza semena je v določenih kritičnih primerih nezadostna metoda za odkrivanje vzrokov moške neplodnosti, kajti še vedno določen odstotek moških z normalnimi vrednostmi standardne analize semena ostaja neploden. Raziskovanje morfologije se je izkazalo kot perspektivna značilnost, pri ugotavljanju oploditvene sposobnosti (Zorn, 2014). Namen naloge je bil izbrati, prilagoditi in optimizirati metodo, za rutinsko pripravo preparata. Preizkusili smo različne fiksacije med katerimi se je najbolj izkazala aldehidna fiksacija v kombinaciji z osmijem. Pri pripravi krovnih stekelc smo najboljše rezultate dobili z adhezivom Alcian modrim. Po pričakovanju najmanj deformacij celic dobimo s sušenjem pri kritični točki. Največji problem s katerim smo se srečali je bilo nekontrolirano in neselektivno prilepljanje oziroma odplavljanje celic iz krovnih stekelc. Zato smo spiranje in dehidracijo na krovnih stekelcih predstavili v centrifugirke. Posledično smo tako opustili tudi sušenje pri kritični točki ter ga zamenjali s HMDS. Tudi pri tej metodi so se celice nekontrolirano prilepljale in odplavljale iz krovnih stekelc. Zato smo preizkusili novo metodo lovljenja celic na membranski filter, ki se nam je izkazala kot najbolj uporabna, saj smo zajeli ves vzorec. Tako je nepogrešljiva pri vzorcih z majhno koncentracijo semenčic. Kot dopolnitev smo prilagojene postopke priprave semena preizkusili za pripravo svežega in v parafin vklopljenega tkiva moda podgane. Z uporabo dvostopenjske aldehidne fiksacije in sušenjem pri kritični točki smo izdelali uporabne preparate iz svežega tkiva moda podgane in pripravili preparate iz parafinskih rezin, za pregled z VEM. Metoda bi tako lahko bila v pomoč za pregled biopsij, oziroma preverjanja strukture aspiriranih semenčic iz moda ter retrogradno analizo parafinskih rezin. Metoda priprave semenčic za pregled z VEM, ki smo jo razvili in optimizirali, je ponovljiva in daje sliko, ki najbolj ustreza naravni obliki semenčice. Primerna je za rutinsko uporabo in lahko služi kot dodaten pripomoček pri odločitvi zdravnika o nadaljnjih zdravstvenih postopkih.

## 6.2 SUMMARY

Quality and evaluation of semen and related ability of male fertility is rooted in the classical estimation of parameters of quality of the semen. In certain critical cases, the basic semen analysis method is not good enough to detect the cause of male infertility, because there remains a certain percentage of men with normal values of standard semen analysis that remain infertile. Exploring the semen morphology turned out to be the most promising feature in determining the fertilizing ability (Zorn, 2014). We studied the surface structure of sperm by scanning electron microscopy. The purpose of the thesis was to select, adjust and optimize a method for routine sample preparation. Among the protocols we tested, the adapted procedure of fixation with aldehyde fixative and osmium postfixation enabled the best fixation, reliability, repeatability and comparability of results. Initially, samples were applied on a coverglass, dehydrated in a graduated alcohol line, and dried at the critical point. The biggest problem was uncontrollable loss of the material due to its not sticking to the surface and frequently being washed away. Preparation of coverglass with different adhesives gave us similar results, but the spermatozoa cells were still washed away. Dehydration on the coverglass was then replaced by dehydration in centrifuge tubes. Consequently, we also abandoned the drying at the critical point, which is more difficult and time - consuming, and replaced it with HMDS. With this method, the spermatozoa cells were uncontrollably stuck to the surface or were being washed away from coverglass. Next we tested a new method of processing the cells on membrane filter instead of coverglass, which turned out to be most useful because we were able to preserve the whole sample. This is essential for samples with low concentrations of spermatozoa. In addition, we wanted to apply the adapted processes on the preparation of fresh and paraffin embedded tissue of testis of rat, which might help to examine biopsies or check the structure of the spermatozoa in testis and retrograde analysis of paraffin tissue samples. We developed and optimized the method of preparing spermatozoa to examine with SEM that is highly reproducible and gives equivalent image. It is suitable for routine use and can serve as an additional tool to a doctor deciding on further medical treatment.

## 7 VIRI

- Andjelić S., Drašlar K., Lumi X., Yan X., Graw J., Facsko' A., Hawlina M., Petrovski G. 2015. Morphological and proliferative studies on ex vivo cultured human anterior lens epithelial cells – relevance to capsular opacification. *Acta Ophthalmologica*, 93: 499-506
- Atkins P.W. 1980. *Physical chemistry*. New York, W. H. Freeman and Company: 975 str.
- Bavdek S. 1986. *Temelji embriologije za študente veterinarske medicine*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 217 str.
- Boyde A., Maconnachie E. 1980. Morphological correlations with dimensional change during SEM specimen preparation. V: *Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy*. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.). O' Hare, *Scanning Electron Microscopy*: 129-136
- Echlin P. 1978. Coating techniques for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. V: *Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy*. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.). O' Hare, *Scanning Electron Microscopy*: 109-132
- Braet F., De Zanger R., Wisse E. 1996. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *Journal of Microscopy*, 186, 1: 84-87
- Bray D.F., Bagu J., Koegler P. 1989. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microscopy Research and Technique*, 26, 6: 489-495

- Breznik B. 2013. Napovedna vrednost laboratorijskih preiskav semena za oploditveno sposobnost semenčic v postopku in vitro fertilizacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta : 68 str.
- Chemes H.E., Rawe V.Y. 2003. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction*, 9, 5: 405-428
- Echlin P. 1978. Coating techniques for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy: 109-132
- Edwards R.G., Brody S.A. 1995. Spermatogenesis, Ejaculation and Spermatozoa. V: Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. Edwards R.G., Brody S. A. (ur.). Philadelphia, W.B. Saunders Company: 49-108
- Escalier D. 1990. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *International Journal of Developmental Biology*, 3: 287-297
- Fekonja N., Štrus J., Tušek Žnidarič M., Knez K., Vrtacnik Bokal E., Verdenik I., Virant-Klun I. 2014. Clinical and Structural Features of Sperm Head Vacuoles in Men Included in the In Vitro Fertilization Programme. *BioMed Research International*, 2014: 927841, 12 str.
- Fekonja N. 2014. Izvor vakuol v glavi človeških spermijev in njihov pomen v humani reprodukciji. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 46 str.
- Gaudet A.D., Kokko E.G. 1984. Application of scanning electron microscopy to paraffin-embedded plant tissues to study invasive processes of plant - pathogenic fungi. *Phytopathology*, 74: 1078-1080



- Goodhew P.J., Humphreys J., Beanland R., 2000. Electron microscopy and analysis. New York, Taylor & Francis: 242 str.
- Hearle J.W.S., Sparrow J.T., Cross P.M. 1974. The use of scanning microscope. Oxford, Pergamon Press Ltd.: 278 str.
- Inoue T., Osatake H. 1988. A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: the t-butyl alcohol freeze - drying method. Archives of Histology and Cytology, 51, 1: 53-59
- Jesenovac N. 1990. Izbrani postopci analiza u kliničko biokemijskim laboratorijima, 2. zvezek. Beograd, Društvo medicinskih biokemičara Jugoslavije: 305 str.
- Kališnik M. 2003. Oris histologije z embriologijo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 440 str.
- Kessel R.G., Kardon R.H. 1982. Atlas of Human Sperm Morphology. Baltimore, Williams and Wilkins: 86 str.
- Kiernan J.A., 1990. Histological and histochemical methods: Theory & practice. Oxford, Pergamon Press plc.: 433 str.
- Kierszenbaum A.L., Tres L.L. 2012. Histology and cell biology: an introduction to pathology. Philadelphia, Elsevier: 734 str.
- Knez K. 2009. Vpliv morfologije spermijev na izid postopka neposrednega vnosa spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI) v programu zunajcelične oploditve. Diplomski naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 69 str.
- Kovačič B. 2014. Priprava semena za oploditev z biomedicinsko pomočjo. V: Andrologija. Zorn B. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 331-351

Kruger T.F., Franken D.R., Menkveld R. 1993. Strict 1-2-3. A self teaching program for strict sperm morphology. Tygerberg - Capetown, MQ Medical: 155 str.

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

Küpker W., Al-Hasani S., Schulze W., Kühnel W., Schill T., Felberbaum R., Diedrich K. 1995. Morphology in intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12, 9: 620-626

Küpker W., Schulze W., Diedrich K. 1998. Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: the significance of sperm morphology. *Human Reproduction*, 13, Suppl 1: 99–106

Leicabiosystems-fixation-and-fixatives, 2016.

<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-2-factors-influencing-chemical-fixation-formaldehyde-and-glutaraldehyde> (1. dec. 2015)

Lentz T.L. 1971. Cell fine structure: an atlas of drawings of whole cell structure. Philadelphia, Saunders company: 437 str.

Lutar M. 2009. Priprava vzorcev halofilnih nitastih gliv za vrstično elektronsko mikroskopijo. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 52 str.

Maugel T.K., Bonar D.B., Creegan W.J., Small E.B. 1980. Specimen preparation techniques for aquatic organisms. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy: 57-77

Mazia D., Schatten G., Sale W. 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *The journal of cell biology*, 66: 200-204

- McKinney R.E. 1953. Staining Bacterial Polysaccharides. *Journal of bacteriology*, 66: 453-454
- Milutinović Živin A. 2014. Histologija moških spolovil - spermatogeneza. V: *Andrologija*. Zorn B. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 52-66
- Nilsson L., Hamberger L. 2007. *Od spočetja do rojstva*. Ljubljana, Modrijan: 240 str.
- Nowell J.A., Pawley J.B. 1980. Preparation of experimental animal tissue for SEM. V: *Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy*. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy: 1-19
- Nussdorfer P., Virant-Klun I., Drašlar K., Tomažević T., Meden-Vrtovec H. 2003. Scanning electron microscopy assay of sperm cells used in in vitro fertilization procedures. *Proceedings of the 6th multinational congress on microscopy - European extension; 2003 Jun 1-5. Pula, Croatian society for electron microscopy*: 248-249
- Pasqualotto F.F., Sharma R.K., Kobayashi H., Nelson D.R., Thomas A.J. Jr., Agarwal A. 2001. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of Andrology*, 22: 316-322
- Pawlina W. 2016. *Histology*. 7 ed. Philadelphia, Wolters Kluwer: 984 str.
- Peterlin B., Hodžić A. 2014. Citogenetske in molekularno genetske preiskave pri neplodnem moškem. V: *Andrologija*. Zorn B. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 204-210
- Pollak N. 2003. Optimizacija metode za preučevanje oblike kvasnih celic z vrščino elektronsko mikroskopijo. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 44 str.
- Reljič M. 2014. Intrauterina inseminacija in moške indikacije. V: *Andrologija*. Zorn B. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 343-351

- Rode J. 1991. Zgradba prebavil mokrice *Cylisticus convexus* de Geer. Magistrska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 95 str.
- Romeis B. 1989. Mikroskopische Technik. V: Neubearbeitete Auflage. Böck P. (ur.). München, Urban & Schwarzenberg: 697 str.
- Sarmiento P.L., Ciarmela M.L., Thevenet P.S., Minvielle M.C., Basualdo J.A. 2006. Comparison of preparation techniques of mixed samples (fungi-helminth eggs) for scanning electron microscopy by critical point drying. *Parasitology Research*, 99: 455-458
- Sathanathan A.H. 1996. Visual atlas of human sperm structure and function for assisted reproductive technology. Melbourne, La Trobe and Monash Universities: 279 str.
- Sathanathan A.H. 2013. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: a personal survey. *Micron*, 44: 1-20
- Scott J.E., Quintarelli G., Dellovo M.C. 1964. The chemical and histochemical properties of Alcian Blue I. The mechanism of Alcian Blue staining. *Histochemie*, 4: 73-85
- Shively S., Miller W.R. 2009. The use of HMDS (hexamethyldisilazane) to replace Critical point Drying (CPD) in the preparation of tardigrade for SEM (Scanning Electron Microscope) imaging. *Transaction of the Kansas*, 112, 3/4: 198-200
- Tüttelmann F., Nieschlag E. 2010. Classification of andrological disease. V: *Andology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Nieschlag E. (ur.). Berlin, Springer: 87-92
- Virant - Klun I., Meden - Vrtovec H., Tomaževič T. 2002. Od nastanka gamet do rojstva: oploditev z biomedicinsko pomočjo: teoretični in slikovni prikaz nastanka gamet, zgradbe gamet in tehnik oploditve z biomedicinsko pomočjo. Radovljica, Didakta: 255 str.

- Vraspir-Porenta O. 2005. Moška spolovila. V: Histologija. Zorc M., Petrovič D. (ur.). Ljubljana, Inštitit za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta: 207-218
- Vlaisavljević V., Knez J. 2014. ICSI metoda izbora za zdravljenje moške neplodnosti. V: Andrologija. Zorn B. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 353-363
- Waterman R. 1980. Preparation of embryonic tissues for SEM. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy: 21-44
- Watson L.P., McKee A.E., Merrell B.R. 1980. Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy: 45-56
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. 5th edition. Geneva, World Health Organization: 271 str.
- Zorn B. 2004. Metode zdravljenja neplodnosti pri moškem z azoospermijo na Ginekološki kliniki v Ljubljani v obdobju 1995-2003. V: Jubilejni zbornik ob 20-letnici rojstva prvih otrok, spočetih po postopku zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki v Ljubljani. Meden-Vrtovec H. (ur.). Ljubljana, Ginekološka klinika: 32-34 str.
- Zorn B., Ihan A., Kopitar A.N., Kolbezen M., Sesek-Briski A., Meden-Vrtovec H. 2010. Changes in sperm apoptotic markers as related to seminal leukocytes and elastase. Reproductive Biomedicine Online, 21, 1: 84-92
- Zorn B. 2014. Moška neplodnost: patološka fiziologija - vzroki in mehanizmi moške neplodnosti. V: Andrologija. Zorn B. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 132-167
- Zorn B. 2014. Klinična obravnava neplodnega moškega. V: Andrologija. Zorn B. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 168-193

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Kazimirju Drašlarju za vodenje pri magistrski nalogi.

Zahvaljujem se somentorici prof. dr. Sandri Milutinović Živin za konstruktivne pripombe.

Prof. dr. Rudi Zorc-Pleskovič se najlepše zahvaljujem, da mi je omogočila dokončanje naloge na Inštitutu za histologijo in embriologijo in za vso pomoč pri nalogi.

Prof. dr. Jasni Štrus se zahvaljujem za nasvete in koristne napotke pri pregledu naloge.

Prof. dr. Brankotu Zornu, se zahvaljujem, da sem lahko vstopila v svet andrologije.

Zahvaljujem se Inštitutu za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete, kjer sem lahko opravljala svoje delo ter Androloškemu laboratoriju Ginekološke klinike za pomoč pri pripravi vzorcev.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki ste mi kakorkoli pomagali in me bodrili. Brez vas naloge ne bi bilo. Hvala.