

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katja KNEZ

**VPLIV MORFOLOGIJE SPERMIJEV NA IZID  
POSTOPKA NEPOSREDNEGA VNOSA SPERMIJA V  
CITOPLAZMO JAJCNE CELICE (ICSI) V  
PROGRAMU ZUNAJTELESNE OPLODITVE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katja KNEZ

**VPLIV MORFOLOGIJE SPERMIJEV NA IZID POSTOPKA  
NEPOSREDNEGA VNOSA SPERMIJA V CITOPLAZMO JAJCNE  
CELICE (ICSI) V PROGRAMU ZUNAJTELESNE OPLODITVE**

DIPLOMSKO DELO  
univerzitetni študij

**INFLUENCE OF SPERM MORPHOLOGY ON THE OUTCOME OF  
INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) IN *IN VITRO*  
FERTILIZATION PROGRAMME**

GRADUATION THESIS  
university studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za oploditev z biomedicinsko pomočjo na Ginekološki kliniki in v Androloškem laboratoriju v Leoniču, v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana ter v IVF laboratoriju bolnišnice *Bleueets Hospital* v Parizu, Francija.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 12.09.2008 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževića, za somentorja doc. dr. Irma Virant - Klun in za recenzenta prof. dr. Gregorja Majdiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIC  
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Član: doc. dr. Irma VIRANT - KLUN  
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika, Oddelek za reprodukcijo

Član: prof. dr. Gregor MAJDIČ  
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Katja KNEZ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 611.013.1 : 616.697 : 616.177 - 089.888.11 (043.2)
KG	moška neplodnost/ spermij/ morfologija spermija/ spermogram/ neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice/ ICSI/ injekcija morfološko izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice/ IMSI/ razvoj zarodkov
AV	KNEZ, Katja
SA	KNEŽEVIČ, Miomir (mentor) / VIRANT - KLUN, Irma (somentor)
KZ	SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	VPLIV MORFOLOGIJE SPERMIJEV NA IZID POSTOPKA NEPOSREDNEGA VNOSA SPERMIJA V CITOPLAZMO JAJČNE CELICE (ICSI) V PROGRAMU ZUNAJTELESNE OPLODITVE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVI, 77, [14] str., 19 pregl., 33 sl., 4 pril., 86 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	Najpogosteji vzrok moške neplodnosti je slaba kakovost semena. Ključna metoda zdravljenja moške neplodnosti je neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI). Morfologija spermija in integriteta njegove DNK vplivajo na oploditveno sposobnost spermija, razvoj zarodka in zgodnji splav. Še vedno ni dobro poznan vpliv morfologije spermijev na izid postopka ICSI. Namen tega dela je bil oceniti morfologijo spermijev neplodnih moških in ugotoviti vpliv morfologije spermijev na izid postopka ICSI pri teh moških. Naredili smo razmaze semena, s katerim je bil narejen postopek ICSI, jih obarvali po Papanicolaou ter pod 1000-kratno povečavo določili morfologijo spermijev. Med običajno morfološko oceno spermijev in izidom postopka ICSI (stopnjo oploditve, razvojem zarodkov do razvojne stopnje morule in blastociste in nosečnostjo) ni bilo nobene povezave. Na izid postopka ICSI (stevilo razvojno zaustavljenih zarodkov in število zarodkov slabe kakovosti, ki niso primerni za prenos v maternico ali zamrzovanje) vplivajo nepravilnosti glave spermijev v semenskem izlivu, ne pa nepravilnosti drugih delov spermija - vratu, srednjega dela ter repa. Nato smo pri moških z najtežjimi oblikami moške neplodnosti s posebno, novo metodo IMSI (neposredni vnos morfološko izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice) selecionirali spermije z normalno morfologijo in ugotavliali, če smo na ta način izboljšali rezultate postopka ICSI. Pri običajnem postopku ICSI se za injekcijo izbere normalno izgledajoč spermij pod 400-kratno povečavo, pod katero okvare finih struktur spermija ostanejo nevidne. Pri postopku IMSI pa se pod najmanj 6000-kratno povečavo izbere gibljiv spermij z normalno glavo in bazo ter brez vakuol v glavi. Vakuole, ki so vidne samo pod sistemom IMSI, so namreč lahko odsev poškodb jedra oz. DNK spermija. Z morfološko normalnimi spermiji, izbranimi pod 6000-kratno povečavo, smo injicirali jajčne celice ter opazovali razvoj zarodkov v primerjavi z razvojem zarodkov po običajnem postopku ICSI. Dobljeni rezultati so nakazali, da ima morfologija spermija na nivoju IMSI pomemben vpliv na izid postopka ICSI.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DD UDC 611.013.1 : 616.697 : 616.177 - 089.888.11 (043.2)  
CX male infertility/ sperm/ sperm morphology/ spermogram/ intracytoplasmic sperm injection/ ICSI/ intracytoplasmic morphologically selected sperm injection/ IMSI/ embryo development  
AU KNEZ, Katja  
AA KNEŽEVIČ, Miomir (supervisor) / VIRANT - KLUN, Irma (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme of Biotechnology  
PY 2009  
TI INFLUENCE OF SPERM MORPHOLOGY ON THE OUTCOME OF INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) IN *IN VITRO* FERTILIZATION PROGRAMME  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO XVI, 77, [14] p., 19 tab., 33 fig., 4 ann., 86 ref.  
LA sl  
AL sl / en  
AB The most frequent cause of male infertility is poor semen quality. The main treatment for male infertility is intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Fertilization rate, embryo development and early abortion depend on sperm morphology and its DNA integrity. The influence of sperm morphology on ICSI outcome is still unknown. The aim of the present study was to evaluate sperm morphology of infertile men and find out the influence of sperm morphology on ICSI outcome. Smears were made from the same semen that was used for ICSI. Smears were stained with Papanicolaou stain and sperm morphology was evaluated under magnification of 1000x. No significant correlation was found between ICSI outcome (fertilization rate, morulae rate, blastocyst rate and pregnancy) and morphologic evaluation of sperm. It was found that morphologic abnormal sperm heads in raw ejaculate affect ICSI outcome (number of developmental arrested embryos and number of embryos of poor quality, that are not suitable for transfer or cryopreservation); other malformations, like abnormal neck, middle piece and tail do not affect ICSI outcome. On patients that had severe male infertility new method IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) for selection of sperm with normal morphology was used to see if IMSI improves ICSI outcome. Using conventional ICSI, sperm is chosen under magnification of 400x under which malformations of fine sperm structures stay unseen. With IMSI, motile sperm with normal head, base and absence of vacuoles in the head is chosen under magnification of 6000x. Vacuoles, which are seen only under IMSI system, reflect DNA damage of sperm. Oocytes were injected with morphologically normal sperm, selected under magnification of 6000x, and IMSI outcome was compared with ICSI outcome. Results indicated that sperm morphology has important influence on ICSI outcome.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovar	XIII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 SPERMATOGENEZA	1
1.2 MOŠKA NEPLODNOST	2
1.3 ICSI	3
1.4 IMSI	3
1.5 CILJ RAZISKAVE	4
1.6 DELOVNE HIPOTEZE	4
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>5</b>
2.1 SPERMIJ	5
<b>2.1.1 Morfologija spermija</b>	5
<b>2.1.2 Ultramorfologija spermija in njegova patologija</b>	6
<b>2.1.3 Spermiogram</b>	8
2.1.3.1 Ocena morfologije spermijev	9
2.1.3.2 Merila za ocenjevanje morfologije spermijev	10
2.1.3.3 Nenormalna morfologija spermijev pod svetlobnim mikroskopom	10
2.2 ICSI	12
<b>2.2.1 Postopek ICSI</b>	12
2.2.1.1 Spermiji iz semenskega izliva	12
2.2.1.2 Spermiji iz mod ali nadmodka	13
2.2.1.3 Spermatide iz semenskega izliva ali mod	14
2.2.1.4 Prednosti in slabosti postopka ICSI	14
<b>2.2.2 Kakovost spermijev in izid postopka ICSI</b>	16
<b>2.2.3 DNK spermijev</b>	18
<b>2.2.4 Otroci rojeni po postopku ICSI</b>	21
2.3 IMSI	23

<b>2.3.1 Postopek IMSI</b>	23
<b>2.3.2 Vakuole in DNK poškodbe</b>	30
<b>2.3.3 Otroci rojeni po postopku IMSI</b>	34
<b>2.4 NOVEJŠE, NEINVAZIVNE TEHNIKE IZBORA SPERMIJEV PRI MOŠKIH S SLABO KAKOVOSTJO SEMENA</b>	34
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	36
<b>3.1 POTEK DELA</b>	36
<b>3.2 METODE</b>	37
<b>3.2.1 Ocena vpliva morfologije spermijev na izid postopka ICSI</b>	37
3.2.1.1 Priprava razmaza semena za ocenjevanje morfologije spermijev	37
3.2.1.2 Barvanje razmaza semena po Papanicolaou	37
3.2.1.3 Ocena deleža morfološko normalnih spermijev	38
3.2.1.4 Statistično ugotavljanje povezave med morfologijo spermijev in izidom postopka ICSI	38
<b>3.2.2 Ocena vpliva selekcije morfološko normalnih spermijev (IMSI) na izid ICSI</b>	40
3.2.2.1 Priprava semena za postopka IMSI in ICSI	40
3.2.2.2 Priprava posodic za postopek ICSI	41
3.2.2.3 Priprava posodic za postopek IMSI	42
3.2.2.4 Priprava posodic za jajčne celice	43
3.2.2.5 IMSI postopek	44
3.2.2.6 ICSI postopek	48
3.2.2.7 Razvoj zarodkov	49
3.2.2.8 Primerjava izidov postopkov IMSI in ICSI	51
3.2.2.9 Atlas morfologije spermijev, določene s sistemom IMSI	51
<b>4 REZULTATI</b>	52
<b>4.1 OCENA VPLIVA MORFOLOGIJE SPERMIJEV NA IZID POSTOPKA ICSI</b>	52
<b>4.2 OCENA VPLIVA SELEKCIJE MORFOLOŠKO NORMALNIH SPERMIJEV (IMSI) NA IZID POSTOPKA ICSI</b>	54
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	62
<b>5.1 RAZPRAVA</b>	62
<b>5.2 SKLEPI</b>	68
<b>5.3 PRIHODNOST</b>	68
<b>6 POVZETEK</b>	69
<b>7 VIRI</b>	70
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Referenčne vrednosti SZO za oceno kakovosti semena	8
Preglednica 2: Tipi slabe kakovosti semena	9
Preglednica 3: Specifične morfološke nepravilnosti celičnih organelov spermija, opazne z metodo MSOME	23
Preglednica 4: Primerjava med izidi postopkov IMSI in ICSI	24
Preglednica 5: Stopnja oploditve, razvoja zarodkov in razvoj blastocist glede na tri razrede spermijev po Cassuto-Barak klasifikaciji	27
Preglednica 6: Spermiji treh razredov po HAVBIC in Cassuto-Barak klasifikaciji	28
Preglednica 7: Izidi klasičnega IVF postopka glede na vakuoliziranost spermijev	31
Preglednica 8: Materiali za barvanje po Papanicolaou	38
Preglednica 9: Materiali za postopka IMSI in ICSI	43
Preglednica 10: Število najdenih spermijev na preparat	52
Preglednica 11: Delež normalnih in nenormalnih spermijev in deleži spermijev s posameznimi morfološkimi nepravilnostmi	52
Preglednica 12: Povezava med morfologijo spermijev in izidom postopka ICSI (logistična regresija)	53
Preglednica 13: Povezava med morfologijo spermijev in izidom postopka ICSI (Spearmanov koeficient korelacije)	53
Preglednica 14: Indikacije neplodnosti bolnikov, ki so imeli postopek IMSI	54
Preglednica 15: Število najdenih spermijev razreda I in II po Cassuto-Barak klasifikaciji	54
Preglednica 16: Morfologija spermijev, ocenjena s sistemom IMSI	56
Preglednica 17: Podatki o postopku, jajčnih celicah, semenu ter razvoju zarodkov po postopku ICSI oz. IMSI	59
Preglednica 18: Izidi postopkov IMSI in ICSI	61
Preglednica 19: Izid postopka IMSI glede na uporabljen medij za upočasnitev spermijev (PVP vs. SpermSlow®)	61

## KAZALO SLIK

Slika 1: Spermatogeneza	1
Slika 2: Primeri slabe morfologije spermijev- teratozoospermija	2
Slika 3: Spermiji pod 6000-kratno povečavo	4
Slika 4: Spermiji pod 400-kratno povečavo	4
Slika 5: Spermij	5
Slika 6: Ultramorfologija spermija	6
Slika 7: Spermiji, barvani po Papanicolaou pod svetlobnim mikroskopom	10
Slika 8: Morfološke nepravilnosti spermijev	11
Slika 9: Neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice	13
Slika 10: Izid postopka ICSI glede na število COC kompleksov	14
Slika 11: Izid postopka ICSI glede na izvor in stanje uporabljenih spermijev	15
Slika 12: Morfološko normalni in nenormalni spermiji po kriteriju MSOME	24
Slika 13: Spermiji druge izbire	25
Slika 14: Stopnja oploditve s spermiji treh razredov po Cassuto-Barak klasifikaciji	28
Slika 15: Spermiji, vidni pod Nomarski in Hoffman optičnim sistemom	29
Slika 16: Vrstična elektronska mikroskopija spermijev	30
Slika 17: Klasifikacija spermijev glede na velikost in število vakuol	32
Slika 18: Shema poteka dela – hipoteza 1	36
Slika 19: Shema poteka dela – hipoteza 2	36
Slika 20: Priprava razmazov semena	37
Slika 21: Potek gradientnega centrifugiranja	40
Slika 22: Potek spiranja	40
Slika 23: Potek metode splavanja na površje	41
Slika 24: Posodica za postopek ICSI	41
Slika 25: Posodica za postopek IMSI	42
Slika 26: Posodica za selekcionirane spermije	42
Slika 27: Posodica za jajčne celice	43

Slika 28: Mikroskop za postopek IMSI v Laboratoriju za OBMP, Ginekološka klinika, UKC Ljubljana	45
Slika 29: Izbor morfološko normalnega spermija pod 6000-kratno povečavo	47
Slika 30: Spermij v mikroinjekcijski pipeti pod 6000-kratno povečavo	47
Slika 31: Potek postopka ICSI	49
Slika 32: Oplojena jajčna celica normalne kakovosti	49
Slika 33: Blastocista 4AA	51

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Laboratorijski obrazec za spermiogram

Priloga B: Laboratorijski obrazec za postopek zunajtelesne oploditve

Priloga C: Preglednica: Morfogram spermijev in izid postopka ICSI

Priloga D: Atlas morfologije spermijev, ocenjene s sistemom IMSI

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

♂/♀	ime bolnika oz. partnerja / ime bolnice oz. partnerke
*	darovano seme
¤	odmrznjene jajčne celice
A	astenozoospermija
Bl	blastocista
C	celični (npr. 2C- dvocelični)
CBAVD	angl. congenital absence of vas deferens / slov. prirojena odsotnost semenovodov
CFTR	angl. cystic fibrosis transmembrane regulator / slov. transmembranski urejevalec cistične fiboze
COC	angl. cumulus-oocyte complex / slov. kompleks kumulus-jajčna celica
CREM	angl. cAMP-responsive element modulator / slov. urejevalec cAMP odgovarjajočega elementa
deg	degeneracija
DIC optika	angl. differential interference contrast / slov. diferencialna interferenčna kontrastna optika
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E	razvojno zaustavljen zarodek
ELSI	podolgovata (elongirana) spermatida
En	endometrioza
ET	angl. embryo transfer / slov. prenos zarodka
ex	zavržen zarodek
FISH	fluorescenčna hibridizacija <i>in situ</i>
GV	germinalni vezikel
HA	hialuronska kislina
HAVBIC	head/glava, akrosom, vakuola, baza, insercija (vsaditev repa), citoplazmatski ostanek
ICSI	angl. intracytoplasmic sperm injection / slov. neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice
IMSI	angl. intracytoplasmic morphologically selected sperm injection / slov. neposredni vnos morfološko izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice
IVF	<i>in vitro</i> fertilizacija; zunajtelesna oploditev; umetna oploditev
IVF-ET	zunajtelesna oploditev s prenosom zarodkov v maternico

JC	jajčna celica
M I	jajčna celica v metafazi I
M II	jajčna celica v metafazi II
MACS	angl. magnetic-activated cell sorting / slov. ločevalnik magnetno označenih celic
MAR	angl. mixed antiglobulin reaction / slov. reakcija z antiglobulini
Mo	morula
MS	mikromanipulacijski sistem
MSOME	angl. motile sperm organellar morphology examination / slov. pregled morfologije organelov gibljivega spermija
O	oligozoospermija
OAT	oligoastenoteratozoospermija
P	statistična značilnost
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PN	pronukleus
PVP	polivinilpirolidon
RNK	ribonukleinska kislina
ROS	angl. reactive oxygen species/ slov. reaktivne kisikove spojine
ROSI	okrogla spermatida
SCSA	angl. sperm chromatin structure assay / slov. pregled kromatinske strukture spermija
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
SOD	superoksid dismutaza
Sperm Prep®	Sperm Prep medij
SRY	angl. sex-determining region on the Y chromosome / slov. spol določajoče področje na kromosomu Y
SS	SpermSlow® medij
SZO/WHO	slov. Svetovna zdravstvena organizacija / angl. World Health Organization
T	teratozoospermija
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
TUNEL	angl. terminal deoxyribonucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling / slov. označevanje fragmentirane DNK s terminalno deoksinukleotidil transferazo in dUTP (označenim)
V	vakuole
Z	zamrznjen zarodek
ZP	angl. zona pellucida / slov. cona pelucida

## SLOVAR

Pojem	Razlaga
Akrosom	del glave spermija, obdan z akrosomalno membrano, v kateri so encimi (akrozin, hialuronidaza), potrebni za razgradnjo kumulusa in cone pelucide jajčne celice ob oploditvi; encimi se sprostijo iz akrosoma v procesu akrosomske reakcije
Akrosomska reakcija	se sproži z zlitjem zunanje akrosomalne membrane in plazmatske membrane spermija, pri čemer se sprosti vsebina akrosomalnih veziklov, ki vsebujejo encime za razgradnjo kumulusa, da lahko spermij prodre do jajčne celice
Aksonema	snop mikrotubulov, ki poteka skozi rep spermija; v glavnem delu repa je 9 parov perifernih in 1 centralni par mikrotubulov; omogoča gibanje repa
Anevploidija	nenormalna spremembra števila kromosomov v celici
Astenozoospermija	manj kot 50% spermijev v semenu je negibljivih; slaba gibljivost spermijev
Azoospermija	stanje, ko v semenskem izlivu ni spermijev
Blastocista	je zarodek, ki ima že razviti dve različni liniji celic, to sta trofoblast in embrioblast, ter votlinico (blastocel); celice v blastocisti se že diferencirajo; zarodek se v maternico ugnezdi na razvojni stopnji blastociste, kar je zadnja razvojna stopnja zarodka, ki lahko še živi in se razvija v pogojih <i>in vitro</i> ; zarodek doseže stanje blastociste na 5. dan po oploditvi
Blastomera	celica zarodka; do ~8-celične razvojne stopnje so vse blastomere pluripotentne
Cassuto-Barak klasifikacija	ocenjevanje spermijev na podlagi normalnosti glave, baze in prisotnosti vakuol v glavi; razvrstitev ocenjenih spermijev v tri razrede (I, II in III)
Centriol	znotrajcelični organel, pomemben za nastanek delitvenega vretena med mejizo; v jajčno celico ga prinese spermij; okoli centriola se pričnejo radialno urejati centrosomski proteini in zvezdasti mikrotubuli (angl. aster) in tako nastaja centrosom zigote, ki je pomemben za zbližanje in zlitje pronukleusov
Citoplazmatski ostanek	ostanek večje količine citoplazme na srednjem delu spermija; posledica nepopolne spermatogeneze; kaže na nezrelost spermija
Cona pelucida	mukopolisaharidna ovojnica, ki obdaja jajčno celico; v to ovojnico segajo iz ene strani mikrovilusi jajčne celice, z druge stani mikrovilusi folikularnih celic; na tem mestu nastane tesen stik med jajčno celico in folikularnimi celicami, kar omogoča intenzivno izmenjavo snovi, potreбno za rast in dozorevanje jajčne celice; v coni pelucidi so tudi tri glikoproteinska receptorska mesta za vezavo spermijev (ZP1, ZP2 in ZP3)
Degeneracija	propad, izroditev, odmrтje
Disomija	dva enaka homologna kromosoma enega starša
DNK	deoksiribonukleinska kislina; visokopolimerne dvoverižne molekule; večinoma v celičnem jedru; nosilka genetske informacije
Endometrioza	rast endometrijskega tkiva tudi izven maternice; vzrok nastanka je neznan, nastane na organih v trebušni votlini; ciste, ki so posledica endometrioze, vsebujejo predvsem staro kri; lahko vodi v neplodnost
Fragmentacija DNK	prelomi verige DNK, ki nastanejo zaradi razgradnje z restriktionskimi encimi ali zaradi različnih dejavnikov okolja

Fragmentacija zarodka	pojav brezjedrnih fragmentov v zarodku; razpadanje zarodka; kazalec slabe kakovosti zarodka; način za odstranjevanje nenormalnih celic (apoptoza)
Gameta	spolna celica; pri ženski jajčna celica, pri moškem spermij
Germinalni vezikel	stanje, ko jedro jajčne celice vsebuje pare homolognih kromosomov in ostaja v profazi prve mejotske delitve; ni še prišlo do izginotja jedra; jajčna celica je v tem stanju nezrela in ni sposobna oploditve
Globozoospermija	nepravilna morfologija spermija, ki ima okroglo glavo brez akrosoma
HAVBIC klasifikacija	ocenjevanje spermija na podlagi normalnosti glave, akrosoma, baze in insercije (vsaditve) repa ter odsotnosti citoplazmatskega ostanka in vakuol
Imobilizacija spermija	postopek, pri katerem se pod 400-kratno povečavo z mikroinjekcijsko pipeto udari spermij po repu, da obstane na mestu; s tem ga lažje ujamemo in vsesamo (aspiriramo) v pipeto; s tem se aktivira membrana spermija, kar ima za posledico večjo možnost oploditve; nato spermij injiciramo v jajčno celico
Jajčna celica v mejozi I	prva mejotska delitev; profaza I še poteka ali pa se je že končala; nima izločenega polarnega telesca
Jajčna celica v mejozi II	druga mejotska delitev; jajčna celica, ki je končala I. mejotsko delitev; če je v metafazi II, se je izločilo polarno telesce
Kapacitacija spermija	je aktivacija spermija in priprava za oploditev; med kapacitacijo se s površine spermija odstranijo substance nadmodka in semenske plazme, ki preprečujejo akrosomsko reakcijo; omogoča spermiju, da med celicami kumulusa prodre do jajčne celice; med procesom se spremeni lipidna zgradba membrane spermija (odstrani se holesterol), pojavi se hiperaktivno gibanje
Klasični IVF postopek	je klasični postopek zunajtelesne oplodite z osemenitvijo (inseminacijo) jajčne celice; izvaja se v primerih ženske neplodnosti in normalne kakovosti semena partnerja
Klinična nosečnost	nosečnost, ki poteka že tako dolgo, da se na ultrazvoku vidi gestacijska vrečka in utripanje zarodkovega srčka; opazna je rast maternice; za razliko od <i>kemične</i> nosečnosti, pri kateri se meri koncentracija hormona HCG (humani horionski gonadotropin) v krvi, nosečnost pa še ni zanesljiva
Kromatin	je DNK-proteinski kompleks, v katerega je v evkariontski celici močno zapakirana DNK, da ne plava gola v celičnem jedru in je zaščiten; DNK je navita okoli histonov (v spermijih okoli protaminov)
Kromosomska aberacija	sprememba v številu kromosomskih garnitur, številu kromosomov posamezne garniture ali spremembu števila in razporeditve genov na kromosому
Krugerjev/striktni kriterij	kriterij za ocenjevanje morfologije spermijev; po tem kriteriju mora imeti normalno seme vsaj 14% morfološko normalnih spermijev
Kumulus	masa foliklovih celic okoli cone pelucide jajčne celice
Levkocitospermija	stanje, ko je v semenu en milijon ali več levkocitov na ml; pokazatelj vnetja
Makrocefalija	povečana glava spermija
Mejoza	redukcija delitev; vrsta celične delitve, pri kateri se število kromosomov zmanjša za polovico in pride do izmenjave genetskega materiala oz. novih kombinacij v dedni zasnovi; v procesu mejoze nastajajo gamete
Metoda FISH	fluorescenčna hibridizacija <i>in situ</i> ; metoda molekularne genetike za ugotavljanje aneuploidij in strukturnih nepravilnosti kromosomov pri različnih celicah
Mikrocefalija	čisto majhna, slabo opazna glava spermija

Mikroskopija SEM	vrstična elektronska mikroskopija, ki omogoča prostorsko opazovanje celičnih struktur; omogoča opazovanje zunanje strukture glave spermija
Mikroskopija TEM	transmisijska elektronska mikroskopija, ki omogoča vpogled v notranje strukture celice; omogoča 2D informacijo o karioplazmi
Mitoza	običajna celična delitev; pred mitozo se DNK podvoji; hčerinski celici imata enako število kromosomov kot materinska; tako se delijo vse somatske celice
Morula	zarodek; kepica iz približno 16 do 32 celic, ki nastanejo po celični delitvi oplojene jajčne celice v jajcevodu ali <i>in vitro</i>
Moška neplodnost	vzrok za neplodnost para je slaba kakovost partnerjevega semena ali prisotnost protiteles proti spermijem
MSOME kriterij	kriterij, po katerem je morfološko stanje jedra spermija določeno tako po obliku kot po kromatinski vsebnosti
Nekrozoospermija	stanje, ko je večina spermijev v semenskem izlivu mrtvih
Nepravilnost CBAVD	bilateralna aplazija semenovoda; stanje, ko pri moškem ni semenovoda
Nukleolus	funkcionalna struktura celičnega jedra; tu se sintetizirajo ribonukleinske kisline ribosomov (rRNA) in do izrabe se le-te ohranljajo v citoplazmi celice
Običajna morfološka ocena spermijev	je odstotek morfološko normalnih spermijev v semenskem izlivu; izvaja se na fiksiranih in barvanih preparatih spermijev pod 1000-kratno povečavo; za ocenitev morfološkej se uporabi merila SZO
Obolenje OAT	oligoastenoteratozoospermija; obolenje neplodnih moških, ki imajo v semenskem izlivu zelo malo spermijev s slabo gibljivostjo in slabo morfološko
Oligozoospermija	koncentracija spermijev je manj kot 20 milijonov na ml semena
Oploditev	spojitev ženske in moške spolne celice; spojitev jajčne celice in spermija
Plod	človeški plod po dveh mesecih razvoja, ki ima že popolnoma človeški videz
Polarno telesce	manjša, nefunkcionalna celica na površini jajčne celice, ki propade; vsebuje kromosome in zelo malo citoplazme
Poliploidija	stanje, ko ima organizem tri ali več kompletov kromosomov; stanje, ko imajo celice organizma tri ali več kompletov kromosomov
Postopek ET	prenos zarodka v maternico s katetrom v postopku zunajtelesna oploditve
Postopek ICSI	neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice; ena najpomembnejših metod zdravljenja moške neplodnosti
Postopek IMSI	modificirana metoda postopka ICSI, pri kateri se za injekcijo v citoplazmo jajčne celice izbere morfološko najbolj normalen spermij, izbran pod veliko povečavo (6000-kratno)
Postopek IVF	fertilizacija <i>in vitro</i> , umetna oploditev, zunajtelesna oploditev
Postopek IVF-ET	fertilizacija <i>in vitro</i> s prenosom zarodka v maternico
Postopek OBMP	oploditev z biomedicinsko pomočjo
Postopek TUNEL	določanje fragmentacije DNK oz. programirane celične smrti (apoptoze) celic
Postopek/ ciklus	proses, ko zaradi neplodnosti para pri bolnici po hormonskem spodbujanju jajčnikov pridobimo jajčne celice z ultrazvočnim izsesavanjem (aspiracijo), pripravimo seme partnerja in izvedemo zunajtelesno oploditev
Pronukleus	jedro, vidno v oplojeni jajčni celici, v njen sta dva pronukleusa - en od jajčne celice in eden od spermija

PVP	polivinilpirolidon; močno viskozna kemična snov, v kateri se pripravi spermije pred postopkom ICSI; zaradi velike viskoznosti PVP medija se gibljivost spermijev močno zmanjša, kar olajša vsesavanje (aspiracijo) spermija v pipeto in manipuliranje s spermijem pred injiciranjem v jajčno celico
Razvojno zaustavljen zarodek	zarodek, ki je zaostal v razvoju zaradi genetskih ali presnovnih napak; zarodki lahko razvojno zaostanejo na dvo ali štiri celični stopnji razvoja ali na stopnji morule
Semenski izliv/ seme	vsebuje semensko tekočino in spermije; semenska tekočina vsebuje še epiteljske celice sečnice, levkocite, eritrocite, zarodne celice
Sertolijeve celice	oporne celice v semenskih cevkah; imajo oskrbovalno nalogu ter izločajo mnogo hormonov, ki so pomembni za razvoj spermijev
Spermatida	haploidna celica, ki se v procesu spermiogeneze pretvori v spermij
Spermatogeneza	nastajanje moških gamet, spermijev v modu
Spermij	moška spolna celica ali gameta; semenčica
Spermiji druge izbire	kadar med spermiji ni moč najti spermija, ki bi bil morfološko popolnoma normalen, se izbere t.i. spermij druge izbire - spermij, ki ima najmanj morfoloških nepravilnosti
Spermiogeneza	pretvorba spermatid v spermije
SpermSlow®	glavna komponenta medija SpermSlow® je hialuronska kislina; uporablja se za selekcijo zrelih spermijev; lahko se ga uporabi kot medij za upočasnitve gibanja spermijev; zreli spermiji se vežejo na hialuronsko kislino in na mestu gibljejo; pomemben medij za postopek IMSI
SRY	gen, ki določa moški spol; SRY protein je t.i. TDF (angl. <i>Testis determining factor</i> ), ki prične z določevanjem moškega spola; mutacija gena SRY vodi v neplodnost
Stopnja nosečnosti	se izračuna kot število žensk, ki je zanosilo, na prenos zarodka ali na postopek
Stopnja oploditve	se izračuna kot število oplojenih jajčnih celic (z dvema pronukleusoma (2PN)) na število injiciranih jajčnih celic
Stopnja razvoja blastocist	se izračuna kot število blastocist na število oplojenih jajčnih celic (2PN)
Stopnja splava	se izračuna kot število nosečih žensk, ki je imelo splav, na prenos zarodka ali na postopek
Stopnja ugnezditve	se izračuna kot število ugnezdenih zarodkov ali gestacijskih vrečk na število prenesenih zarodkov
Teratozoospermija	manj kot 30% spermijev v semenu je morfološko nenormalnih; slaba morfologija spermijev
Ugnezditev zarodka	zarodek se v procesu nosečnosti vraste v steno maternice; zarodek je na razvojni stopnji blastociste ali kasne morule
Vakuola	s celičnim sokom napolnjen prostor v notranjosti celice, kamor se začasno ali stalno odlagajo razne snovi, ki ob presnovi nastajajo v citoplazmi; vakuolizacija jajčne celice ali glave spermija kaže na slabšo kakovost gamet ali degeneracijo
Zarodek	majhen skupek celic, ki nastane iz oplojene jajčne celice znotraj cone pelucide
Zvezdasti mikrotubuli	mikrotubuli v obliki zvezde (angl. aster), ki obdajajo centrosom; tvori se v citoplazmi celice med mitozo; vežejo se na kinetohore kromosomov

## 1 UVOD

Za razliko od ženske je v semenu zdravega moškega ogromno spolnih celic - od 20 milijonov do več kot 100 milijonov spermijev. V naravnih razmerah je le peščica spermijev sposobna oploditve. V postopku zunajtelesne oploditve pa se srečujemo z bolniki, ki imajo malo spermijev in včasih pri tem postopku zadostuje za oploditev že en sam spermij (Virant - Klun, 2004).

### 1.1 SPERMATOGENEZA

Spermij je majhna, gibljiva moška gameta, ki potuje vzdolž ženskega genitalnega trakta, da najde jajčno celico in se združi z njo v procesu oploditve. Spermij nastane v procesu spermatogeneze, ki se začne med puberteto na stopnji spermatogonija po predhodni, pripravljalni dobi (predspermatogeneza) v obdobju zarodka, ploda in otroka. Ko moški spolno dozori, se spermatogoniji pričnejo naprej deliti. Spermatogeneza poteka v modu, natančneje v semenskih cevkah, v več fazah (slika 1):

#### 1. Mitotska delitev spermatogonijev

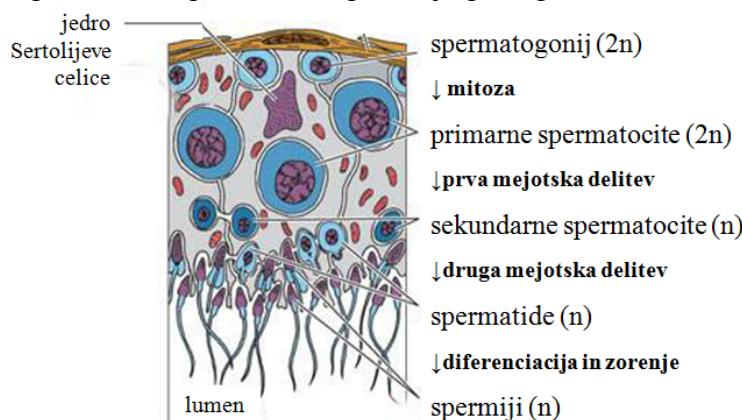
V vsem življenjskem obdobju v modu zdravega moškega nastane dva trilijona ali več spermijev, ki se razvijejo iz prvotno samo 1000 do 2000 diploidnih spermatogonijev. Vsi predspermatogoniji so z mitotsko delitvijo nastali v modu ploda. Ločimo zgodnji tip A (delimo 4 podtipa), vmesno fazo in pozni tip B spermatogonijev, ki se mitotsko delijo, pri čemer nastanejo diploidne primarne spermatocite.

#### 2. Mejotska delitev spermatocit

Mejoza, tako kot pri jajčni celici, poteka v dveh fazah - kot mejoza I in mejoza II. Mejoza I se prične v primarnih spermatocitah. Po podaljšani profazi mejoze po prvi mejotski delitvi nastaneta dve haploidni sekundarni spermatociti. Med podaljšano profazo se zmanjša število kromosomov iz diploidnega v haploidno in pride do izmenjave genetskega materiala. Nadalje po drugi mejotski delitvi nastanejo štiri haploidne okrogle spermatide.

#### 3. Pretvorba okroglej spermatid v spermije (spermiogeneza)

V procesu spermiogeneze se spermatide pretvorijo v spermije. V spermatidah je DNK močno kondenzirana. Pomemben del dozorevanja spermatid je dozorevanje jedra, pri čemer se proteini histoni zamenjajo s protamini. Zorenje spermatid vključuje rast repa in izgubo citoplazme, pri čemer se iz spermatide postopoma razvije spermij, ki je gibljiv in ima oploditveno sposobnost s pomočjo postopka ICSI.



Slika 1: Spermatogeneza (Purves in sod., 2004).

Spermiji v modu so zaradi nezrelosti večinoma negiblji, na mestu giblji ali počasi progresivno giblji. Sprostijo se iz moda in potujejo skozi nadmodek, pri čemer nadalje zorijo. Dozorevanje spermijev vključuje morfološke, fiziološke in presnovne spremembe.

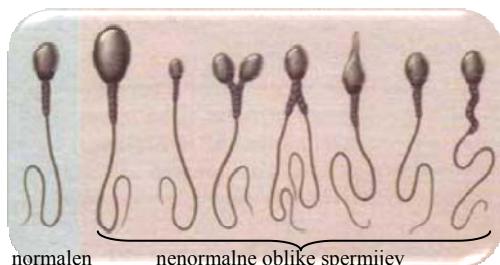
Potek spermatogeneze urejajo številni geni (prek 200). Izredno pomembnih je vsaj 18 genov (CREM, AZF, CFTR, SRY, receptor za androgene, DAZ, DAX-1). Spermatogeneza je stalen proces. Proces spermatogeneze od spermatogonija do gibljivega spermija traja pri človeku približno 2 meseca. Ob normalni spermatogenezi vsak dan približno 1,5 milijona spermatogonijev začne nov ciklus diferenciacije. V reproduktivnem obdobju moškega nastane približno 30 milijonov spermijev na dan (Virant - Klun in sod., 2002a).

## 1.2 MOŠKA NEPLODNOST

Pod izrazom oploditev z biomedicinsko pomočjo (OBMP) razumemo različne postopke zdravljenja neplodnosti. Neplodnost prizadene vsak sedmi par v Evropi. Pri dveh tretjinah parov se pojavlja neplodnost moških samostojno ali v povezavi z neplodnostjo žensk. Če je vzrok za neplodnost slabša kakovost partnerjevega semena, govorimo o moški neplodnosti. Ta je lahko prirojena ali pridobljena. Prirojene neplodnosti povzročijo genetske nepravilnosti zarodka in vplivi okolja v času razvoja spolnih žlez. Pridobljena neplodnost pa je posledica škodljivih vplivov okolja (npr. bolezni, strupov itd.) po rojstvu. Včasih so prirojeni in pridobljeni vzroki tako prepleteni, da jih težko opredelimo. Vzroke neplodnosti lahko razdelimo tudi drugače: na tiste, pri katerih je moten razvoj spermijev v modih, in na druge, pri katerih je moten prenos zrelih spermijev iz mod v sečnico in iz nje ob spolnem odnosu v nožnico. Včasih vzroka za neplodnost moškega ne najdemo; takrat govorimo o idiopatski neplodnosti.

Med genetske vzroke moške neplodnosti spadajo nepravilnosti spolnih in avtosomnih kromosomov ter genetske mutacije (mikrodeleci kromosoma Y). Negenetski vzroki moške neplodnosti so retinirano modo, varikokela, vnetje moda, nadmodka, sečnice, hormonski vzroki, imunski vzroki, spolne motnje, motnje erekcije in ejakulacije, rak moda, sindrom Kartagener, način življenja, zdravila, sevanja in strupi, onesnaženo okolje in psihološki stres.

Najpogostejsi vzrok moške neplodnosti je slaba kakovost semena. Moški so neplodni zaradi oligozoospermije, astenozoospermije ali teratozoospermije (slika 2). Pogosto so omenjene nepravilnosti med seboj povezane; govorimo o oligoastenoteratozoospermiji (obolenje OAT). Moška neplodnost je lahko tudi posledica nekrozoospermije, ko je vitalnost spermijev zelo slaba in je večina spermijev v semenskem izlivu mrtvih.



Slika 2: Primeri slabe morfologije spermijev- teratozoospermija (Morfologija spermijev, 2009).

Azoospermija je najtežja oblika moške neplodnosti, ko v semenskem izlivu ni spermijev ali pa so v semenskem izlivu prisotna protitelesa proti spermijem, ki povzročajo zlepjanje spermijev. Ločimo obstruktivno in neobstruktivno azoospermijo. Obstruktivna azoospermija je lahko posledica prirojene odsotnosti semenovodov (nepravilnost CBAVD) ali pa nastane zaradi aplazije med modom in nadmodkom. Spermatogeneza je normalna. Pri neobstruktivni azoospermiji pa se motnje v spermatogenezi kažejo kot sindrom Sertolijevih celic, kjer so prisotne le Sertolijeve celice, kot zastoj dozorevanja spermijev ali kot hipospermatogeneza. Vzrok je predvsem v genetskih nepravilnostih.

Moško neplodnost lahko zdravimo z zdravili, s kirurškimi posegi in s tehnikami OBMP (Virant - Klun in sod., 2002a).

### 1.3 ICSI

Pri moških vzrokih neplodnosti ali po predhodnih neuspehih poskusih klasične zunajtelesne oploditve (IVF) se izvaja postopek ICSI.

Postopek ICSI je najpomembnejši postopek za zdravljenje moške neplodnosti. Do razvoja ICSI je bila moška neplodnost skoraj neozdravljiva. S tem postopkom je možno oploditi jajčne celice, kadar je spermijev v semenskem izlivu malo, so slabo gibljivi in imajo zelo slabo morfologijo. Uporablja se ga tudi pri parih z moškim imunskim dejavnikom neplodnosti. Za postopek ICSI se odloči tudi pri parih, pri katerih kljub normalnemu spermiogramu zaradi neznanih vzrokov ne pride do oploditve jajčnih celic po klasičnem IVF postopku. Postopek ICSI je omogočil oploditev jajčnih celic in zanositev s spermiji, pridobljenimi iz nadmodka ali mod pri azoospermikih. Nenazadnje pa lahko s postopkom ICSI oplodimo jajčne celice tudi z nezrelimi zarodnimi celicami (spermatidami) (Virant - Klun in sod., 2002a).

Pri postopku ICSI se pod posebnim, invertnim mikroskopom z mikroorodji na drobno nosilno steklene pipeto previdno prisesa jajčno celico. Z drugo, steklene mikroinjekcijsko pipeto se spermij ujame, imobilizira ter vsesa v pipeto. Nato se previdno prebode cono pelucido in membrano jajčne celice in se injicira spermij v citoplazmo jajčne celice. V vsako jajčno celico se s pipeto injicira po 1 spermiju (Virant - Klun, 2004).

### 1.4 IMSI

Natančnost, s katero se določi normalna morfologija spermijev za postopek ICSI, je odvisna od ločljivosti optičnega povečevalnega sistema. Običajno se postopek ICSI izvaja z uporabo 20 - 40kratnega objektiva, kar da skupno povečavo približno 200 - 400krat (slika 4). Kakorkoli, spermiji lahko pod to povečavo nosijo različne morfološke nepravilnosti, ki se lahko odkrijejo samo z uporabo večje optične povečave, kot se uporablja za postopek ICSI (Hazout in sod., 2006).

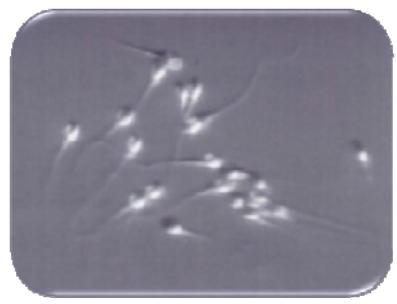
Izboljšava postopka ICSI je IMSI, t.i. neposredni vnos morfološko izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice (angl. *Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm*

*Injection*), ki jo je leta 2002 razvil Bartoov. Pred vnosom spermija v jajčno celico se oceni njegova morfologija pod 6000-kratno povečavo (slika 3). Uporaba postopka IMSI daje bistveno višjo stopnjo nosečnosti (66%) v primerjavi s klasičnim postopkom ICSI (30%) (Bartoov in sod., 2008).

Za postopek IMSI mora biti mikroskop opremljen s 100-kratnim imerzijskim objektivom, s sekundarnim povečevalnim sistemom in DIC optiko. S takšnim sistemom je možno v živem stanju na neobarvanih spermijih odkriti večino morfoloških nepravilnosti, prepoznanih z običajno osnovno analizo morfologije spermijev (merila SZO), ki se drugače opravlja na fiksiranih, barvanih spermijih. Poleg tega se opazi tudi vakuole v glavah spermijev. Vakuole odražajo nenormalnosti vsebine jedra spermija, in sicer nepravilnosti DNK spermija (Hazout in sod., 2006).



Slika 3: Spermiji pod 6000-kratno povečavo.



Slika 4: Spermiji pod 400-kratno povečavo (Jedrne vakuole, 2008).

## 1.5 CILJ RAZISKAVE

Ključna metoda zdravljenja moške neplodnosti je neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI), ki se izvaja, kadar je v semenskem izlivu malo spermijev, so slabo gibljivi (ali negibljivi) in kadar imajo spermiji slabo morfologijo. Še vedno ni dobro poznan vpliv morfologije spermijev na izid postopka ICSI. Namen tega dela je oceniti morfologijo spermijev moških, vključenih v postopek zunajtelesne oploditve in ugotoviti vpliv morfologije spermijev na izid postopka ICSI pri teh moških: na stopnjo oploditve jajčnih celic, razvoj zarodkov do razvojne stopnje morule in blastociste in nosečnost. S posebno metodo IMSI bomo prvič v Sloveniji selezionirali spermije z normalno morfologijo pri moških z najtežjimi oblikami moške neplodnosti in ugotavljal, če smo na ta način izboljšali rezultate ICSI. Diplomsko delo je tudi pomemben del uvajanja metode IMSI za selekcijo spermijev v klinično prakso programa zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki v Ljubljani.

## 1.6 DELOVNE HIPOTEZE

Naše delovne hipoteze so naslednje:

1. morfologija spermijev pomembno vpliva na izide postopka ICSI in
2. s selekcijo morfološko normalnih spermijev izboljšamo izide postopka ICSI.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SPERMIJ

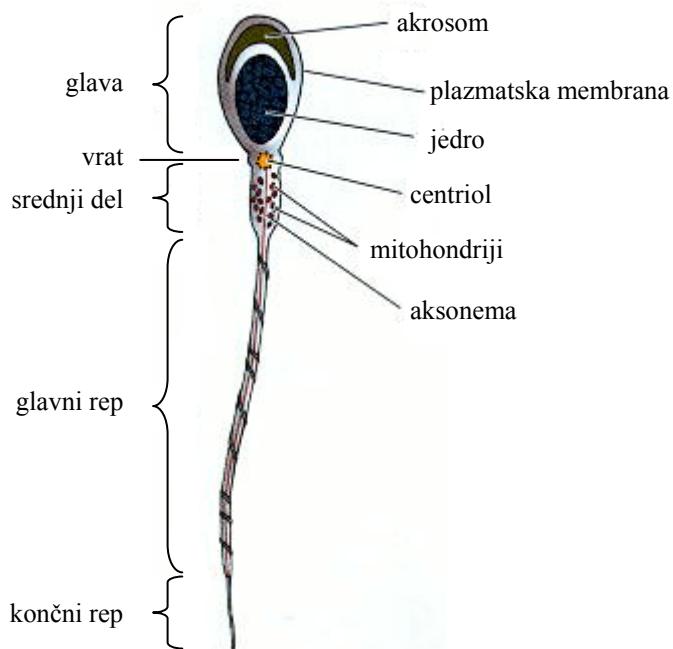
#### 2.1.1 Morfologija spermija

Normalen, zrel spermij sestoji iz ovalne glave, ki vsebuje jedro z genetskim materialom, vratu, srednjega dela in dolgega repa, ki mu omogoča gibanje (slika 5).

Normalna glava spermija je ovalne oblike, dolžine 4 do 5  $\mu\text{m}$  in širine 2 do 3  $\mu\text{m}$ . Akrosom ali kapi podobna struktura pokriva dve tretjini glave spermija. Vsebuje različne encime, ki imajo ob oploditvi pomembno vlogo pri prodiranju spermija skozi ovojnice jajčne celice. Postakrosomalni del glave je sestavljen iz enojne membrane in vsebuje jedro, ki sega prav pod akrosom. Jedro obsega približno 65% glave spermija in vsebuje zelo kompakten kromatin in posamezna področja razpršenega kromatina in vakuol.

Srednji del, ki ga povezuje z glavo komaj viden vrat, je približno 5  $\mu\text{m}$  dolg, 1  $\mu\text{m}$  debel, z mitohondriji obdan spiralast predel, ki vsebuje metabolične encime, potrebne za razgradnjo energetsko bogatih snovi in gibljivost spermijev. Sestavljen je iz centriola, aksoneme in ovojnice iz mitohondrijev, ki ovija aksialni filament v vijačnem vzorcu.

Dolžina repa je med 50 in 55  $\mu\text{m}$ . Rep ima dva različna predela: glavni in končni del. Glavni del repa je najdaljši predel repa, dolžine približno 45  $\mu\text{m}$  in debeline 0,5  $\mu\text{m}$ . Konec repa je dolg 5 do 7  $\mu\text{m}$ . V glavnem delu repa je 9 parov perifernih in 1 centralni par mikrotubulov aksoneme, obdan je s fibrozno ovojnicico, ki jo sestavljajo polkrožni trakovi.



Slika 5: Spermij (Gilbert, 2000).

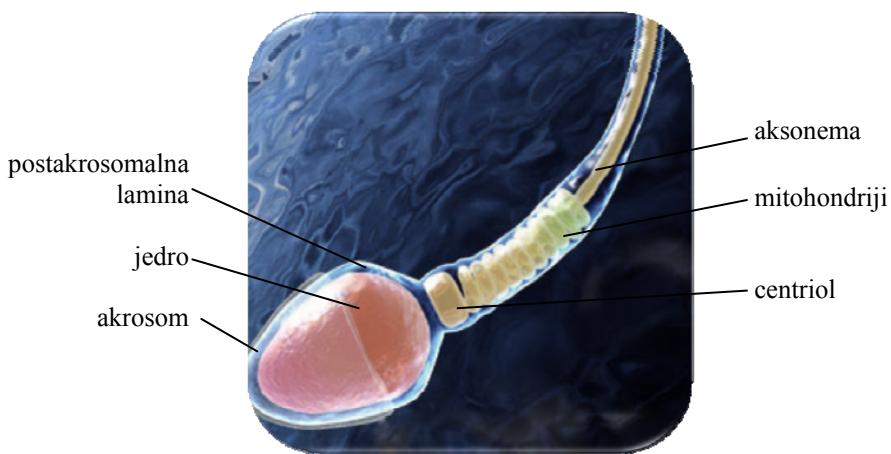
Spermiji preživijo v semenski tekočini *in vivo* približno 24 ur, *in vitro* pa 1 do 4 dni (Virant - Klun in sod., 2002a).

### 2.1.2 Ultramorfologija spermija in njegova patologija

Spojitev spermija z jajčno celico, prvi korak pri nastanku novega življenja, zahteva strukturno normalni, živi in funkcionalno sposobni gameti. Spermiji morajo biti efektivno gibljivi, imeti morajo penetracijske, fuziogene in oploditvene sposobnosti. Ocenitev treh najbolj pomembnih parametrov semena, to je koncentracija, progresivna gibljivost in morfologija spermijev, definirajo sposobnost spermijev za oploditev jajčne celice. Svetlobna mikroskopija lahko razkrije večje morfološke nepravilnosti treh delov spermija, to je glave, srednjega dela in repa, ostali celični organeli in njegove fine strukture pa ostanejo neopažene.

Najpogostejše poškodbe glave spermija so okvare jedrne membrane, akrosoma in neorganiziranost kromatinske strukture. Te okvare fine strukture spermija so povezane z nesposobnostjo prepoznavanja spermij - jajčna celica, vezavo in fuzijo s plazmatsko membrano jajčne celice (oolemma). Spremembe kromatina in znaki dekondenzacije so pogosto povezani s poslabšanjem jedrne membrane in so lahko posledica spermiogeneze (Küpker in sod., 1998).

Akrosom in plazmatska membrana omogočata spermiju penetracijo in fuzijo s plazmatsko membrano jajčne celice. Akrosomalna regija glave spermija se deli v anteriorni akrosom, ki je pomemben za akrosomsko reakcijo, in posteriorni akrosom (t.i. ekvatorialni segment), ki je pomemben za fuzijo membran gamet in aktivacijo jajčne celice (Toshimori in sod., 2008). Okvara akrosoma je najverjetneje najbolj pogost vzrok zmanjšane plodnosti moškega. Glavne strukturne nepravilnosti akrosoma so delna odsotnost, popolna odsotnost, vključki, degeneracija in nerazvitost akrosoma. Neorganiziranost akrosomalne membrane vodi v spremembe oblike jedra. Popolna odsotnost akrosoma spremeni jedrno obliko, kar se kaže kot sferična glava spermija. Ta pojav se imenuje globozoospermija.



Slika 6: Ultramorfologija spermija (3D spermij, 2009).

Da se kot zadnja stopnja oploditvene kaskade doseže združitev pronukleusov, morata imeti tako spermij kot jajčna celica normalno organizirano strukturo jedra. Pod transmisijsko elektronско mikroskopijo (TEM) se jedro spermija vidi kot homogena kompaktna masa kromatina. Normalna struktura jedra spermija je nujno potrebna za dekondenzacijo znotraj jajčne celice in za razvijanje in hidratacijo gosto kompaktnega kromatina. Intenzivna

kondenzacija kromatina poteka med poznimi fazami spermiogeneze, istočasno pa poteka tudi dodajanje akrosoma, kar se kaže v tipični obliku glave spermija. Kondenzacija kromatina je povezana z biokemičnimi spremembami, kot je odstranitev RNA, zamenjava histonov s protamini in tvorba disulfidnih vezi, ki stabilizirajo kromatin. Visoka stopnja agregacije kromatina ščiti zrel spermij pred fizičnimi in kemičnimi poškodbami. Šele znotraj citoplazme aktivirane jajčne celice postane kromatin dekondenziran kot rezultat cepitve disulfidnih vezi in zamenjave protaminov s histoni iz jajčne celice. Strukturne nepravilnosti jedra vključujejo nepopolno ali slabo kondenzacijo kromatina, jedrne vakuole in vključke. Te okvare se pogosto pojavi v povezavi s spremembami v strukturi akrosoma. Velike jedrne vakuole so morfološki znaki biokemičnih sprememb. Spermiji z nepopolno kromatinsko kondenzacijo pogosto vsebujejo enoverižne DNK namesto dvoverižne ali pa kromosomske nenormalnosti (Küpker in sod., 1998).

Jedro spermija se v citoplazmi jajčne celice razpusti in oblikuje se pronukleus v približno eni uri. Medtem se izoblikuje tudi pronukleus jajčne celice. Spermij nosi s seboj centriol, ki omogoča potovanje moškega pronukleusa proti ženskemu pronukleusu; kasneje zagotavlja pola delitvenega vretena za prvo celično delitev zigote, saj jajčna celica nima centriola. Okrog centriola spermija se radialno uredijo centrosomski proteini in zvezdasti mikrotubuli, nastajati prične centrosom zigote (Virant - Klun, 2004; Virant - Klun in sod., 2002a). Centriol, ki je odgovoren za razporeditev zvezdastih mikrotubulov, je poleg jedra najbolj pomemben organel spermija za začetek oploditvenega procesa znotraj jajčne celice (Küpker in sod., 1998). Nepravilnosti vratne regije spermijev s posledično slabšim stikom glava - srednji del imajo slabšo funkcijo centriola, saj niso sposobni zbrati zvezdastih mikrotubulov (Chemes in sod., 2003). Velikost zvezdastih mikrotubulov je pri govedu povezana s plodnostjo (Tesarik in sod., 2002).

S TEM opazimo tudi nepravilni vezni del spermija (osni upogib (aksialna fleksija); ni mikrotubulov, centriola), nepravilni srednji del (ovojnica iz mitohondrijev deloma manjka, je neorganizirana, prazna, ne vsebuje mitohondrijev) in fibrozno ovojnicu, ki je deformirana ali nerazvita. Z mikroskopijo TEM vidimo rep, ki je pod kotom, zvit ali zlomljen. Vidi se aksonemo, ki se pojavlja kot poliaksonema, neorganizirana, z vezikli, zunaj fibrozne ovojnici, s preveč mikrotubuli ali brez perifernih parov mikrotubulov. Vidno je, če v aksonemi ni centralnega para mikrotubulov, če ni perifernih vlaken ter če ni notranjih in zunanjih dineinskih ročic ali radialnih povezav (Virant - Klun in sod., 2002a).

Primerjava spermijev plodnih in neplodnih moških, s katero so določali ultrafino strukturo celičnih organelov, in sicer akrosoma, postakrosomalne lamine, jedra, vratu, aksoneme in mitohondrijske ovojnici je pokazala, da ima neplodna skupina moških bistveno več morfoloških nepravilnosti glave in repa spermijev v primerjavi s plodnimi. Za vsak organel so določili eno od štirih patoloških stanj: nerazvitost, nepopolna razvitost, nepravilnost in degradacija; ali pa nepoškodovano stanje (Bartoov in sod., 1994).

Teratozoospermija je zelo heterogeno stanje, ki obsega spremembe v oblikah različnih delov spermija. Teratozoospermija mora biti razumljena kot kombinacija morfoloških nepravilnosti z ustreznimi poslabšanji v funkciji spermija (Tesarik in sod., 2002).

### 2.1.3 Spermiogram

Spermiogram je preiskava semena, ki vključuje oceno volumna semena, vrednost pH, viskoznosti in barve semenskega izliva, oceno koncentracije spermijev (milijoni/ml), števila spermijev, gibljivosti, morfologije in vitalnosti spermijev. Oceni se tudi prisotnost levkocitov, okroglih celic (predvsem zarodne celice), zlepljanje (aglutinacija) spermijev in prisotnosti protiteles proti spermijem v semenskem izlivu (Priloga A). Zaradi strogih pravil, ki jih Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) določa in priporoča, je spermiogram standardizirana preiskava. Glede na merila SZO je seme normalno, če je v semenu 20 milijonov ali več spermijev na ml, če je gibljivih 50% ali več spermijev in če je v semenu 30% ali več spermijev z normalno morfologijo (preglednica 1). Če je v semenu številčno manj spermijev, govorimo o oligozoospermiji. Če je v semenu manj gibljivih spermijev, govorimo o astenozoospermiji. V primeru slabe morfologije spermijev pa govorimo o teratozoospermiji (slika 2). Pogosto so omenjene nepravilnosti med seboj povezane. Če je v semenu premalo spermijev, so preslabo gibljivi in imajo preslabo morfologijo, da bi lahko spontano oplodili jajčno celico, govorimo o oligoastenoteratozoospermiji (obolenje OAT) (preglednica 2) (Virant-Klun in sod., 2002a).

Preglednica 1: Referenčne vrednosti SZO za oceno kakovosti semena (WHO..., 1999)

Ocena	Referenčna vrednost
Volumen	2,0 ml ali več
pH	7,2 ali več
Koncentracija	$20 \times 10^6$ spermijev/ml ali več
Skupno število spermijev	$40 \times 10^6$ spermijev ali več na semenski izliv
Gibljivost	50% ali več gibljivih spermijev ali 25% ali več spermijev s progresivno gibljivostjo znotraj 60 min po semenskem izlivu
Vitalnost	75% ali več živih spermijev
Bele krvne celice	manj kot $1 \times 10^6$ celic/ml
»Immunobead«	manj kot 50% gibljivih spermijev, vezanih na imuno-kroglice
MAR test	manj kot 50% gibljivih spermijev z adherentnimi delci
Morfologija	30% morfološko normalnih spermijev; podatki iz programov OBMP kažejo, da će pade morfologija pod 15% spermijev normalnih oblik, potem pade tudi oploditvena stopnja <i>in vitro</i>

Čeprav ni sistematične povezave med spermiogramom s slabim rezultatom in neplodnostjo moškega, se ve, da koncentracija spermijev pod 5 milijonov spermijev/ml in slaba morfologija spermijev onemogočata spontano zanositev. Morfologija spermijev je dejavnik, ki močno vpliva na njihovo oploditveno sposobnost. Izkazalo se je, da so morfološke značilnosti in njihove nepravilnosti, ki se pojavljajo v vsakem, tudi normalnem semenskem izlivu, najpomembnejši kazalec za ugotavljanje stopnje plodnosti in izida postopka OBMP.

Če je v semenu en milijon ali več levkocitov na ml, glede na SZO, govorimo o levkocitospermiji. Polimorfonuklearni levkociti v semenu sproščajo aktivne derivate kisika (ROS), ki lahko s tem, da povzročajo peroksidacijo poli-nenasičenih maščobnih kislin v

membrani spermija in z oksidativnim stresom porušijo integriteto DNK spermija, močno poškodujejo funkcionalne lastnosti spermijev (gibljivost, oploditvena sposobnost). ROS sproščajo tudi spermiji slabe kakovosti (slabe gibljivosti ali slabe morfologije), predvsem pa spermiji, pri katerih opazimo večji citoplazmatski ostanek. Sproščanje derivatov ROS povzroča zmanjšano plodnost moških. V semenski plazmi je prisoten encimski sistem, imenovan superoksid dismutaza (SOD), ki v sistemu zmanjšuje nastajanje in delovanje ROS. Dejavnost derivatov ROS lahko zmanjšamo z dodajanjem antioksidantov v seme.

Pri nekaterih moških so v semenu prisotna protitelesa proti spermijem (Ig A in Ig G), ki povzročajo močno zlepljanje (aglutinacijo) spermijev in zmanjšajo plodnost moškega. Dokaže se jih z reakcijo z antiglobulinimi, s testom MAR (angl. *Mixed Antiglobulin Reaction*).

Kakovost semena pri moškem se oceni že, ko se odloča za način zdravljenja. Na osnovi spermiograma, ki se naredi v androloškem laboratoriju, se odloči za klasični postopek zunajtelesne oploditve (IVF) ali postopek ICSI. Kakovost semena- volumen semenskega izliva, koncentracijo in gibljivost spermijev se oceni tudi na dan izvedbe postopka oploditve (Virant - Klun in sod., 2002a).

**Preglednica 2: Tipi slabe kakovosti semena (WHO..., 1999)**

Tip	Opis
Oligozoospermija	koncentracija spermijev je manjša od $20 \times 10^6$ spermijev/ml
Astenozoospermija	manj kot 50% gibljivih spermijev
Teratozoospermija	manj kot 30% morfološko normalnih spermijev
Oligoastenoteratozoospermija	motnja vseh treh (lahko se uporabi tudi samo dva prefiksa)
Azoospermija	ni spermijev v semenskem izlivu
Aspermija	ni semenskega izliva

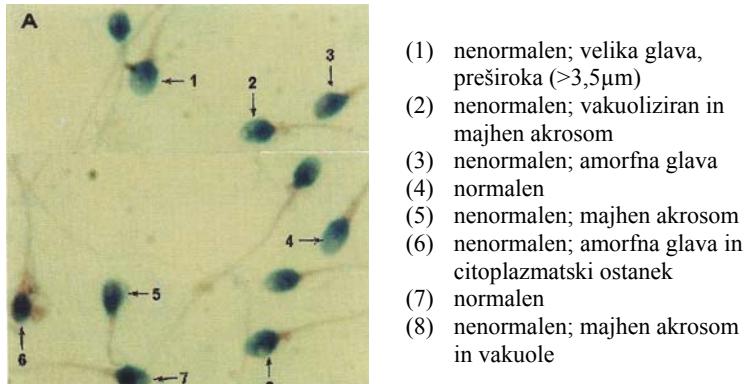
### 2.1.3.1 Ocena morfologije spermijev

Identifikacija in klasifikacija morfoloških nepravilnosti spermijev s svetlobnim mikroskopom predstavlja pravi izziv za citologa, saj se podrobnosti, ki so vidne z elektronskim mikroskopom, ne dajo jasno ovrednotiti v svežem aliobarvanem preparatu semenskega izliva.

Skrbna ocena morfologije spermijev zahteva upoštevanje natančno določenih meril prepoznavanja morfološko normalnih oblik spermijev in razlikovanje le-teh od različnih nepravilnih oblik, ki so tudi prisotne v semenskem izlivu. Morfološke analize semena se izvaja z uporabo svetlobnega mikroskopa pri 1000-kratni povečavi. Razmaz nativnega vzorca semena na objektnem steklu se fiksira in obravnavata po tehniki Papanicolaou (modificirani za spermije). Priporočajo se tudi druge tehnike barvanja, kot so barvanje po Giemsu, Bryan-Leishmanu, Shorru in Diff Quick barvanje (Virant - Klun in sod., 2002a).

Barvanje po Papanicolaou obarva akrosomalne in postakrosomalne regije glave, citoplazmatski ostanek, srednji del in rep. Po barvanju je glava spermija nežno modre barve v akrosomalni regiji in temno modre v postakrosomalni regiji. Srednji del se obarva

rdeče, rep pa modro ali rdečkasto. Citoplazmatski ostanek se barva zeleno (slika 7) (WHO..., 1999).



Slika 7: Spermiji, barvani po Papanicolaou pod svetlobnim mikroskopom;  $\sim 1700\times$  povečava (WHO.., 1999).

#### 2.1.3.2 Merila za ocenjevanje morfologije spermijev

Morfologijo spermijev se lahko ocenjuje po merilih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) ali po Krugerjevih merilih.

**Merila SZO:** V semenu normalne kakovost mora biti več kot 30% spermijev z normalno morfologijo. Glave barvanih spermijev so malenkost manjše kot glave živih spermijev, vendar se njihova oblika ne spremeni. Da se spermij smatra kot normalen, morajo biti tako glava, vrat, srednji del in rep normalni. Glava mora biti ovalne oblike, dolžine 4,0 - 5,0  $\mu\text{m}$  in širine 2,5 - 3,5  $\mu\text{m}$ . Razmerje dolžina - širina glave mora biti 1,50 - 1,75. Akrosomalni del mora biti dobro definiran in mora obsegati 40 - 70% površine glave. Srednji del mora biti vitek, v osi pritrjen na glavo, širok manj kot 1  $\mu\text{m}$ , dolžine približno ena in pol krat velikost glave. Citoplazmatski ostanek je lahko velik največ za polovico velikosti normalne glave. Rep mora biti raven, uniformen, ozji kot srednji del, nezvit in dolg približno 45  $\mu\text{m}$  (WHO..., 1999; Virant - Klun in sod., 2002a).

**Striktna Krugerjeva merila:** V semenu plodnega moškega mora biti vsaj 14% spermijev z normalno morfologijo; že stanje s 4 - 14% normalnih spermijev je nenormalno in je povezano s slabšo oploditveno sposobnostjo, 0 - 3% normalnih spermijev pa kaže na resne morfološke nepravilnosti in verjetno nezmožnost oploditve. Dolžina glave morfološko normalnega spermija je 4,0 - 5  $\mu\text{m}$ , širina pa 2,5 - 3  $\mu\text{m}$ . Glava je ovalne oblike. Akrosom zavzema 40 - 70 % volumna glave. Srednji del je velik 6 - 10  $\mu\text{m}$ . Rep je dolg približno 45  $\mu\text{m}$ . Spermij mora biti brez nepravilnosti vratu, srednjega dela in repa. Če je kateri od teh parametrov na meji, se spermij smatra kot nenormalen (Kruger in sod., 1986, 1993).

Primerjalna študija med SZO morfologijo in striktnim kriterijem je pokazala, da je zadnja metoda boljši napovedovalec za oploditev *in vitro* (Enginsu in sod., 1991). Zato se mora, ko se ocenjuje morfološka normalnost spermijev, uporabiti striktni kriterij (WHO..., 1999).

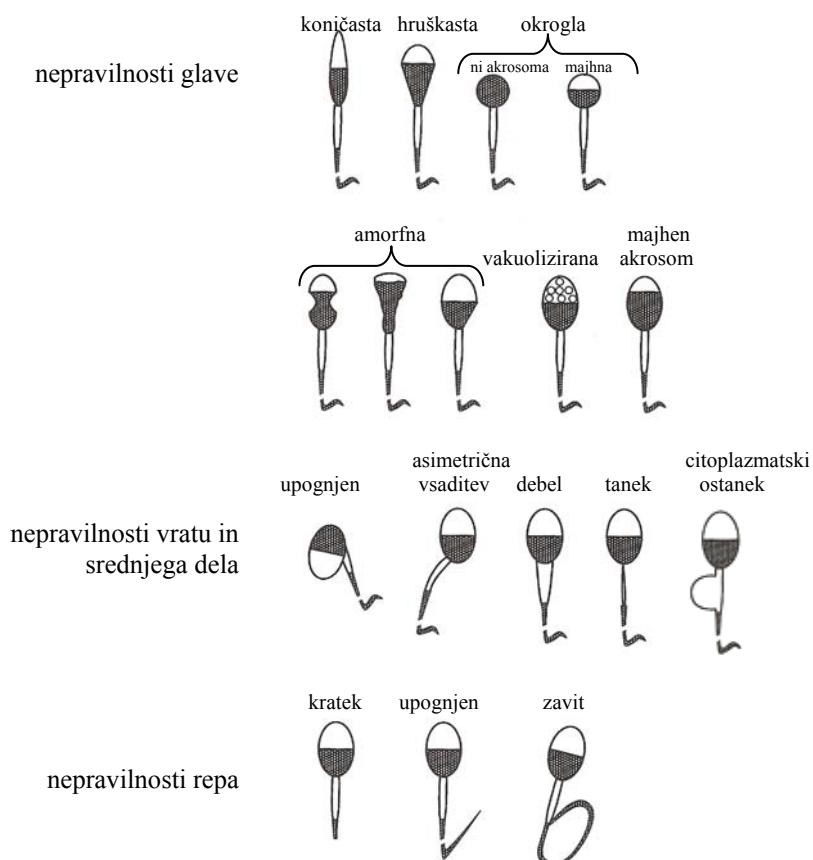
#### 2.1.3.3 Nenormalna morfologija spermijev pod svetlobnim mikroskopom

Med nepravilnostmi glave spermijev se pojavljajo nepravilnosti akrosoma (majhen akrosom: manj kot 40% volumna glave in velik akrosom: več kot 70% volumna glave), strukturne nepravilnosti (hruškasta glava, zelo stanjšana glava na mestu, kjer je pritrjen

rep, zelo stanjšana glava po vsej dolžini, stanjšana glava v sredini, okrogla glava (globozoospermija), nepravilnost površine (neovalna glava), vakuolizirana glava (prisotni več kot 2 vakuoli), nepravilne dimenzije glave (premajhna ali prevelika glava), dvojna glava in dekapitacija (spermij brez glave).

Med nepravilnosti vrata in srednjega dela prištevamo kriv rep (vrat in rep tvorita kot 90 stopinj) in nezrelost spermijev s citoplazmatskim ostankom, ki ponavadi obdaja basalni del glave, srednji del ali rep, in je večji kot ena tretjina površine glave normalne velikosti, asimetrična vsaditev srednjega dela v glavo, debel ali nepravilen srednji del, nenormalno tanek srednji del (ni mitohondrijev), ali kombinacija teh.

Nepravilnosti repa vključujejo nepravilno vsaditev repa (rep izrašča iz nepravilnega dela glave), zavit rep, rep pod kotom 90 stopinj glede na osrednjo os glave, več repov, ki izraščajo iz iste glave, kratek rep in rep nepravilnih širin (slika 8) (Virant - Klun in sod., 2002a; WHO..., 1999).



Slika 8: Morfološke nepravilnosti spermijev (WHO..., 1999).

V vsakodnevni klinični praksi pri klasifikaciji morfoloških nepravilnosti spermijev se v androloškem laboratoriju upošteva naslednja merila: nepravilnosti glave, nepravilnosti repa, vrata, srednjega dela in pojav nezrelih razvojnih oblik spermijev v semenskem izlivu. K nepravilnostim glave prištevamo nepravilnosti akrosoma, nepravilnosti postakrosomalnega predela (nepravilnosti jedra), vakuolizirano glavo, dvoglav spermij, glavo z dvema jedroma in nepravilne velikosti glave. Med nepravilnostmi srednjega dela se išče predvsem citoplazmatski ostanek in podaljšan vrat. Pogosto pa so opazne tudi

nepravilnosti repa (različne dolžine repa, zavit rep in spermij z več repi). Kot nezrele razvojne oblike spermijev pa se v semenu išče spermatocite in spermatide (Virant - Klun in sod., 2002a).

## 2.2 ICSI

### 2.2.1 Postopek ICSI

Pod izrazom oploditev z biomedicinsko pomočjo (OBMP) razumemo različne postopke zdravljenja neplodnosti. Eden izmed najpomembnejših postopkov OBMP je zunajtelesna oploditev (angl. *In Vitro Fertilization - IVF*) s prenosom zarodkov (postopek IVF-ET) za zdravljenje neplodnosti, če prejšnje zdravljenje z različnimi zdravili, hormonskimi preparati in kirurškimi postopki ni bilo uspešno. V primerih indikacije ženske neplodnosti in normalne kakovosti semena partnerja se izvede klasični postopek zunajtelesne oploditve (postopek IVF), pri katerem se po nadzorovanem hormonskem spodbujanju jajčnikov izsesa jajčne celice iz jajčnika s pomočjo ultrazvoka in se jih zunaj telesa oplodi s pripravljenim semenom (Virant - Klun in sod., 2002a).

Za zdravljenje moške neplodnosti pa je najpomembnejši postopek neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice - ICSI. Do razvoja postopka ICSI je bila moška neplodnost skoraj neozdravljiva (Virant - Klun in sod., 2002a). Prva nosečnost in rojstvo po prenosu zarodka, pridobljenega s postopkom ICSI, je bila objavljena 4. julija 1992 v *The Lancet* (Palermo in sod., 1992).

Sledil je hiter razvoj postopka, ki ga danes izvaja večina centrov za zdravljenje neplodnosti. S tem postopkom je možno oploditi jajčne celice partneric moških s slabo kakovostjo semena - kadar je spermijev v semenskem izlivu malo, so slabo gibljivi in imajo zelo slabo morfologijo. Uporablja se ga tudi pri parih z moškim imunskim dejavnikom neplodnosti. Za postopek ICSI se odloča tudi pri parih, pri katerih kljub normalnemu spermogramu zaradi nepoznanih vzrokov ne pride do oploditve jajčnih celic po klasičnem IVF. Postopek ICSI je omogočil oploditev jajčnih celic in zanositev s spermiji, pridobljenimi iz nadmodka ali mod pri azoospermikih. Nenazadnje pa se lahko s postopkom ICSI oplodijo jajčne celice tudi z nezrelimi zarodnimi celicami (spermatidami). Postopek ICSI lahko imenujemo tudi mikromanipulacija (Virant - Klun in sod., 2002a).

Pri približno dveh tretjinah moških v postopku zunajtelesne oploditve opazimo slabšo kakovost semena (Virant - Klun, 2004).

#### 2.2.1.1 Spermiji iz semenskega izliva

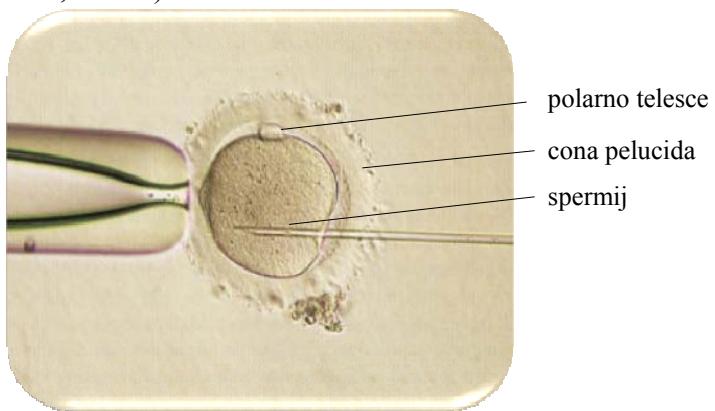
Pred postopkom ICSI se jajčnim celicam z encimom hialuronidazo odstrani kumulus. V istem času se pridobi in prečisti seme partnerja. Pod parafinskim oljem se pripravijo mikrokapljice gojišča, v katerih se v CO<sub>2</sub> inkubatorju pri 37° C in 5% CO<sub>2</sub> ločeno inkubirajo jajčne celice in na poseben način prečiščeni spermiji. Izvorno se metoda izvaja tako, da se pripravljene spermije da v polivinilpirolidon (PVP), ki jih zaradi velike gostote zaustavi, kar olajša izvedbo postopka ICSI. Na Ginekološki kliniki v Ljubljani postopek ICSI izvajajo brez substance PVP zaradi večje naravnosti postopka (Virant - Klun in sod.,

2002a). Uporaba PVP za imobilizacijo spermija pred injiciranjem v jajčno celico lahko zmanjša stopnjo oploditve in kakovost zarodka (Miller in sod., 2001).

Postopek ICSI se izvede pod posebnim, invertnim mikroskopom (200-kratna povečava) s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja približno 2 uri po pridobitvi jajčnih celic. Pod 400-kratno povečavo se izbere morfološko normalno izgledajoč spermij ter se ga z mikroinjekcijsko pipeto (premer 4,8 do 5,6  $\mu\text{m}$ ) imobilizira - udari se ga po repu, da obstane na mestu. S tem se olajša postopek in aktivira membrano spermija, kar ima za posledico večjo možnost oploditve. Nato se spermij vsesa v pipeto. Jajčno celico se prisesa na nosilno stekleno pipeto (premer 18 do 25  $\mu\text{m}$ ) in se jo s tem fiksira (Virant - Klun in sod., 2002a).

Med injiciranjem spermija v citoplazmo jajčne celice mora biti jajčna celica pravilno obrnjena, da z mikroinjekcijsko pipeto ne poškodujemo delitvenega vretena, saj mejoza še ni zaključena. Pravimo, da je polarno telesce glede na uro na poziciji 12 ali 6. Spermij se s pipeto injicira v jajčno celico od stani, na poziciji 3 (čim dlje od polarnega telesca) (Virant - Klun, 2004).

Z mikroinjekcijsko pipeto se previdno predre cono pelucido in membrano jajčne celice. Vsese se malo citoplazme jajčne celice, da ta vdre v mikroinjekcijsko pipeto. Tako se ve, da smo resnično v citoplazmi. Nato se spermij počasi spusti v citoplazmo jajčne celice. Previdno se potegne mikroinjekcijsko pipeto iz celice. V vsako jajčno celico se injicira po en spermij. Po postopku ICSI se jajčne celice dobro spere v gojišču in se jih inkubira preko noči pri 37° C in 5% CO<sub>2</sub>. Naslednji dan se pod mikroskopom pogleda, ali so oplojene (slika 9) (Virant - Klun in sod., 2002a).



Slika 9: Neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice; 200-kratna povečava (Virant - Klun, 2004).

#### 2.2.1.2 Spermiji iz mod ali nadmodka

Pogosto se dogaja, da neplodni moški v semenskem izlivu nimajo spermijev (azoospermija/ aspermija). Pri teh bolnikih androlog z biopsijo ali aspiracijo pridobi spermije iz mod (redkeje nadmodka). Običajno se tkivo zamrzne in se uporabi kasneje.

Tkivo mod se pripravi na poseben način, pri čemer se iz tkiva izolira spermije. Spermiji iz mod so zaradi nezrelosti večinoma negibljeni, zato je postopek ICSI edini možni postopek zunajtelesne oploditve. Gibljivost lahko izboljšamo s hipotavrinom. Spermiji, pridobljeni

iz nadmodka, so pogosto gibljivi, vendar tudi negibljivi niso redkost. Tudi s spermiji iz nadmodka se izvaja samo postopek ICSI. Z negibljivimi spermiji so rezultati zunajtelesne oploditve slabši kot z gibljivimi (Virant - Klun in sod., 2002a; Virant - Klun, 2004).

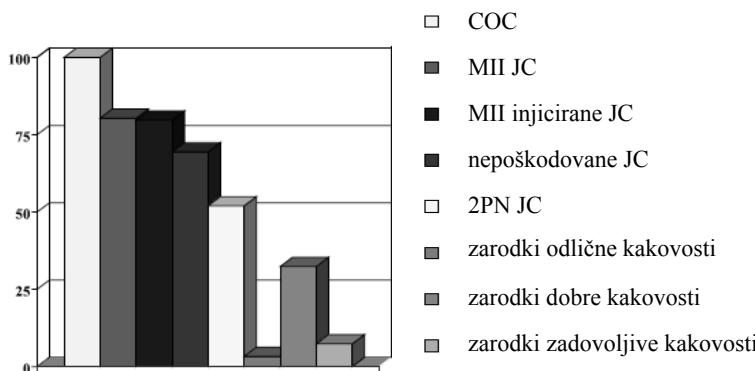
#### 2.2.1.3 Spermatide iz semenskega izliva ali mod

Postopek ICSI je omogočil tudi oploditev jajčnih celic z nezrelimi zarodnimi celicami - spermatidami iz mod ali semenskega izliva. V jajčne celice je možno s postopkom ICSI mikroinjicirati okrogle spermatide (ROSI) ali podolgovate spermatide (ELSI), vendar gre samo za raziskave, ne pa klinično prakso (Virant- Klun in sod., 2002a; Virant-Klun, 2009).

#### 2.2.1.4 Prednosti in slabosti postopka ICSI

Za postopek ICSI potrebujemo samo en spermij s funkcionalnim genomom in centriolom. Postopek ICSI se ne more narediti (Van Steirteghem in sod., 2002; 2003):

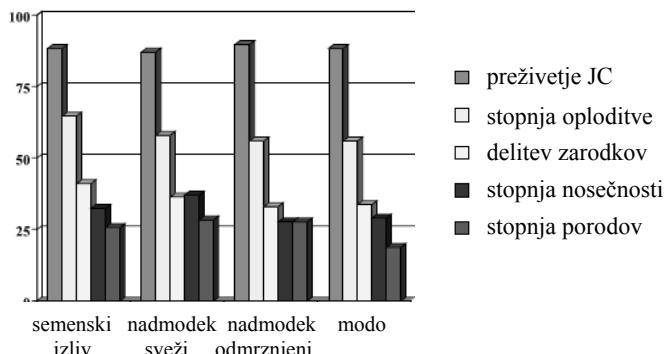
- pri približno 1% ciklov, ker ni kompleksov kumulus-jajčna celica (COC) ali jajčnih celic v metafazi II (MII)
- pri 1% ciklov, ker ni spermijev za mikroinjekcijo
- po nadzorovanem hormonskem spodbujanju jajčnikov se pri 95% žensk najde COC z nepoškodovano cono pelucido; jajčne celice v MII se najde pri 80% COC, medtem ko so ostale jajčne celice v germinalnem veziklu (GV) (10%) ali pa v metafazi I (MI) (5%) (slika 10)
- manj kot 10% injiciranih jajčnih celic je poškodovanih s samim mikroinjekcijskim postopkom



Slika 10: Izid postopka ICSI glede na število COC kompleksov (Van Steirteghem in sod., 2002).

- normalna stopnja oploditve (dva pronukleusa-2PN) injiciranih jajčnih celic je 65% ( $\frac{2}{3}$ )
- nenormalna stopnja oploditve, ki se kaže kot enojni pronukleus ali trije pronukleusi v injicirani jajčni celici, je 4% za enojni pronukleus in 6% za trojni
- približno  $\frac{3}{4}$  normalno oplojenih jajčnih celic se po 24 urah nadaljnjega *in vitro* gojenja razvije v zarodke dobre morfološke kakovosti za prenos v maternico (ena, dve ali tri mitotske delitve in < 20% volumna napolnjenega s fragmenti)
- preživetje jajčnih celic po postopku ICSI, oploditev in delitev zarodkov je podobna pri spermijih iz semenskega izliva, obmodka ali mod (slika 11)
- 90% bolnikov s skrajno moško neplodnostjo ima prenos zarodkov (ET)
- nadštevilne zarodke se globoko zamrzne in shrani v tekočem dušiku (-196° C) za kasnejši prenos v maternico

- stopnja poroda po postopku ICSI je 25%; v primerih, kjer so preneseni večstevilni zarodki (dva ali trije), pa je stopnja nosečnosti 40% do 50% na cikel, vendar je to povezano tudi z večjim deležem večplodnih nosečnosti.



Slika 11: Izid postopka ICSI glede na izvor in stanje uporabljenih spermijev (Van Steirteghem in sod., 2002).

Glavna skrb glede postopka ICSI je njegova varnost. Postopek ICSI je namreč bolj invaziven postopek kot klasični IVF postopek, saj je spermij injiciran skozi cono pelucido in membrano jajčne celice, pri čemer lahko pride do oploditve s spermijem, ki drugače ne bi bil sposoben oploditve (Van Steirteghem in sod., 2002). Prav tako s postopkom ICSI preidemo fiziološke prepreke spermijev, potrebne za oploditev jajčne celice, kot so vezava na cono pelucido jajčne celice, kapacitacija in akrosomska reakcija (Virant - Klun in sod., 2002a).

ICSI zarodki imajo zmanjšan razvojni potencial in so slabše kakovosti, kar je lahko posledica očetovih vplivov ali pa ICSI postopka samega.

DNK spermijev skrajnih OAT bolnikov, torej moških, ki imajo največ koristi od tega postopka, lahko vsebuje nepravilnosti, kot so rahlo pakiranje kromatina in verižne zlome DNK. Če se uporabi postopek ICSI, so ti nenormalni spermiji sicer sposobni doseči oploditev, vendar se lahko nepravilnosti DNK vseeno kažejo v razvojnem zastaju med pred-ugnezditveno fazo. Še več vprašanj je pri postopku ICSI s spermiji iz nadmodka ali mod, saj naj bi bile pri moških z neobstruktivno azoospermijo kromosomske nepravilnosti celo še večje. Pri spermijih iz mod naj bi bilo genetsko vtišnjanje (angl. imprinting) ob času oploditve še nedokončano.

Ker je ICSI invaziven postopek, lahko vodi tudi v fizikalne motnje jedrnih ali citoplazmatskih komponent znotraj jajčne celice, ki so potrebne za nadaljnji razvoj. Če pride do nenatančne pozicije mikroinjekcijske pipete glede na lokacijo delitvenega vretena, lahko poškodba vretena povzroči napake v prvi delitvi, kar vodi v aneuploidijo. Prvo polarno telesce naj bi bilo vedno blizu mejotskega vretena (Miller in sod., 2001).

V nekaterih oplojenih jajčnih celicah se opazi samo en pronukleus. Takšne jajčne celice se lahko normalno razvijejo v zarodek. Po klasičnem IVF postopku je lahko jajčna celica z enim pronukleusom normalno diploidno oplojena (npr. tvorba enega pronukleusa kasni), po postopku ICSI pa nikoli. Po postopku ICSI lahko pomeni en pronukleus v jajčni celici partenogenezo - pojav, pri katerem je jajčno celico aktiviral mehanski dražljaj (npr. mikropipeta v celici), ne pa spermij (Virant - Klun, 2004).

## 2.2.2 Kakovost spermijev in izid postopka ICSI

Na uspešnost postopka ICSI ne vplivajo klasični parametri kakovosti semena – število, gibljinost in običajna morfologija spermijev (Virant-Klun in sod., 2002a).

Pri ICSI ciklih, kjer se uporabi seme skrajnih oligozoospermikov ( $< 1 \times 10^6$  spermijev/ ml), gre v večini primerov za zelo slabo kakovost spermijev (De Vos in sod., 2003).

Zelo je pomembno, da se za imobilizacijo in injekcijo v jajčno celico uporabi gibljin spermij. Pri bolnikih s 100% mrtvimi spermiji (popolna nekrozoospermija) v semenskem izlivu se včasih lahko najde gibljive spermije v modu (Nagy in sod., 1998). Močno progresivna gibljinost je lahko indikator ustrezne presnovne aktivnosti (živosti) spermijev in njihove primernosti za uporabo v zunajtelesni oploditvi. Kadar se za postopek ICSI uporabi žive, vendar negibljive spermije, so razviti zarodki slabše kakovosti in imajo slab razvojni potencial. Spermiji astenozoospermikov imajo večji pojav jedrnih nenormalnosti. Spermiji, ki imajo slabo progresivno gibljinost, imajo tudi višjo pojavnost okvar aksoneme in centriola. Okvarjen centriol, ki ga pri oploditvi podeduje zarodek, pa lahko vodi v kromosomske in jdrne aberacije in nenormalen razvoj (Miller in sod., 2001). Med progresivno gibljinostjo spermija in razvojem blastociste obstaja povezava (Shoukir in sod., 1998).

Mnogo študij je pokazalo, da odstotek morfološko normalnih spermijev v semenu, ocenjenih z običajnimi kriteriji morfologije, ne vpliva na izid postopka ICSI (Küpker in sod., 1995, 1998; Mansour in sod., 1995; Nagy in sod., 1995, 1998; Svalander in sod., 1996; Lundin in sod., 1997; Sukcharoen in sod., 1998; Oehninger in sod., 1998; Ludwig in sod., 2003). Obstajajo pa objave o zmanjšani stopnji oploditve, ugnezditve in nosečnosti v skrajnih, posamičnih primerih popolne teratozoospermije (Tasdemir in sod., 1997), globozoospermije (Liu in sod., 1995) in megalozoospermije (Kahraman in sod., 1999).

Morfološka ocena glede na Krugerjev striktni kriterij se je izkazala uporabna za napoved sposobnosti oploditve spermijev pri klasičnem IVF postopku, vendar pa vse kaže na to, da je le-ta prestrog in zato manj uporaben, ko se uporabi za postopek ICSI (Nagy in sod., 1998; Lundin in sod., 1997). Ko je vzorec spermijev, namenjen za postopek ICSI, ocenjen po striktnem kriteriju, je veliko spermijev ocenjenih kot morfološko nenormalnih, vendar lahko kljub temu oplodijo jajčno celico, ko so enkrat dani vanjo in s tem že obidejo dve naravni oviri, kot sta cona pelucida in plazmatska membrana jajčne celice. Celoten izgled semena namreč ne odseva kakovosti spermija, ki ga uporabimo za postopek ICSI.

Ko se za injekcijo uporabi spermije iz semenskega vzorca, ni večjih omejitev na selekcijskem koraku, saj je na voljo dovolj morfološko normalnih spermijev. Kadar pa se izvaja ICSI na bolj resnih faktorjih moške neplodnosti (skrajni OAT ali azoospermija s posledično kirurško pridobljenim semenom), pa se le-ta konča z injiciranjem morfološko nenormalnih spermijev, ker normalnih spermijev ni na razpolago (De Vos in sod., 2003).

Stopnja oploditve, dobljena s semenskimi vzorci slabe kakovosti ( $< 5\%$  normalnih spermijev), se ne razlikuje od tiste s semenskimi vzorci z boljšo morfologijo spermijev. Enako ni razlik v stopnji klinične nosečnosti. Ena od možnih razlag za to je, da embriolog

za injekcijo izbere gibljiv spermij normalnega izgleda. Dokler je spermij morfološko dober, to ne vpliva na stopnjo ugnezditve in nosečnosti po postopku ICSI. Tudi če so v semenskem izlivu vse oblike spermijev nenormalne, lahko po injekciji sledi oploditev in se lahko doseže nosečnost (Mansour in sod., 1995; Nagy in sod., 1995).

Če so spermiji za injekcijo pridobljeni kirurško, potem je na voljo nižji odstotek morfološko normalnih spermijev. Najvišji odstotek morfološko normalnih spermijev je pri uporabi odmrznjenih spermijev iz nadmodka, nato pri svežih spermijih iz mod, najvišji odstotek morfološko nenormalnih spermijev pa je pri uporabi odmrznjenih spermijev iz mod. Višjo stopnjo oploditve se dobi s spermiji iz nadmodka, saj so morfološko bolj zreli kot pa spermiji iz mod. Rezultat oploditve pri spermijih iz mod je odvisen tudi od tega, ali je prisotna normalna spermatogeneza ali ne; če se uporabi sveže spermije iz mod, je injiciranih več morfološko nenormalnih spermijev v primerih spermatogenetskih napak (neobstruktivna azoospermija) kot v primerih normalne spermatogeneze (obstruktivna azoospermija). Postopek zamrzovanja in odmrzovanja spermijev lahko poslabša izid oploditve (De Vos in sod., 2003).

Glede na različne morfološke nepravilnosti so bile s postopkom ICSI dobljene naslednje stopnje oploditve (De Vos in sod., 2003):

- 63,4% za spermije s podaljšano glavo
- 63,3% za spermije s citoplazmatskim ostankom
- 59,6% za spermije z amorfno glavo
- 34,1% za spermije z zlomljenim vratom
- 57,4% za spermije z dvema nepravilnostma hkrati
- 0% za spermije z okroglimi glavami brez akrosoma
- 66,6% z vakuolami v akrosому.

Pomen morfologije injiciranega spermija na razvoj zarodka je bil objavljen pri mnogih avtorjih (Jones in sod., 1998; Shoukir in sod., 1998; Miller in sod., 2001; Loutradi in sod., 2006; Rawe in sod., 2002; Tesarik in sod., 2005). Morfologija spermija bistveno korelira z razvojem in kakovostjo blastocist. Če delamo ICSI zaradi skrajnega moškega dejavnika neplodnosti, je pričakovana manjša stopnja razvoja blastocist (Miller in sod., 2001).

Bistveno nižji stopnji ugnezditve in nosečnosti sta doseženi po prenosu zarodkov, razvitih iz morfološko nenormalnih spermijev, ne glede na to, ali so iz semenskega izliva ali pa so pridobljeni kirurško. Injekcija morfološko nenormalnih spermijev (amorfne glave, podaljšane glave, prisotnost citoplazmatskega ostanka) daje zarodke z nižjim potencialom za ugnezditve. Tudi če spermij izgleda morfološko normalen, lahko nosi skrite okvare, ki vplivajo na razvoj zarodka in tako onemogočijo normalno potekajočo nosečnost. Slaba kakovost spermija je povezana z integritetu jedra; pri moških s skrajnimi nenormalnostmi je več spermijev s slabo pakiranim kromatinom in prelomi verig DNK.

Nizka povečava (400-kratna) in hkrati slaba resolucija svetlobnega mikroskopa sta omejujoča dejavnika za izbor spermija pri postopku ICSI, zato je natančna in kritična ocena morfoloških odklonov od dobre normalne oblike spermija težka (De Vos in sod., 2003).

### 2.2.3 DNK spermijev

Čeprav jedro spermatide že vsebuje haploidni set kromosomov, avtosomni kromosomi nadaljujejo s sintezo majhne količine ribosomalnih nukleinskih kislin (rRNK), informacijskih ribonukleinskih kislin (mRNK) ter proteinov. Spermatidna DNK pri tem postane močno kondenzirana in obdana z nukleoproteinskimi protamini, ki zamenjajo predhodne nukleoproteinske histone. Če zamenjava histonov s protamini ni zadostna, se oploditvena sposobnost spermija zmanjša. Zaporedje citoplazmatskih in jedrnih sprememb v spermatidi pogojuje nastanek glave spermija. V nadmodku pride tudi do nadaljnega dozorevanja jedra spermija, pri čemer se kompleks DNK-protamini stabilizira z disulfidnimi mostički (Virant - Klun in sod., 2002a).

Spermiji neplodnih moških imajo različne jedrne spremembe. Spermiji imajo lahko nenormalnosti na nivoju DNK, kromatina in kromosomov.

O izvoru poškodb DNK v spermijih obstaja več teorij (Oehninger, 2001; Ozmen in sod., 2007; Sakkas in sod., 2003, Loutradi in sod., 2006):

- Poškodbe so lahko rezultat pakiranja DNK med zamenjavo protaminskih kompleksov s histonskimi med spermogenezo. Verige DNK spermijev so tesno ovite okoli protaminskih molekul, zaradi česar se tvorijo tesne in visoko organizirane zanke. Več kot 2/3 kromatinske strukture spermijev je pakirane s protamini, samo 15% DNK je manj tesno kompaktirano in pakirano s histoni. Neplodni moški imajo višje razmerje histoni:protamini kot plodni moški. Ta sprememba razmerja, ki se ji reče tudi nenormalno pakiranje, poveča občutljivost DNK spermija na zunanje strese zaradi slabše kromatinske kompaktnosti in lahko vodi v fragmentacijo DNK. Nenormalno pakiranje kromatina vodi v nenormalno dekondenzacijo kromatina pri oploditvi. Popolna odsotnost protaminov je bila najdena pri 5 - 15% neplodnih moških.
- Fragmentacija DNK je lahko posledica direktnne oksidativne poškodbe (prosti radikali zaradi pomanjkanja antioksidantov, kajenja, ksenobiotikov, izpostavitve vročini, levkocitne okužbe semena, prisotnost ionov v gojišču za pripravo in gojenje spermijev). Reaktivne kisikove spojine (ROS) lahko povzročajo visoko pojavnost zlomov enoverižnih in dvoverižnih DNK - fragmentacijo DNK. Tako superoksid kot hidroksilni radikal sta znana mutagena in povzročata kromosomske delecije ter sestrskie in dicentrične izmenjave kromatid.
- Alternativno pa so poškodbe DNK tudi posledica apoptoze, ki ima dve vlogi med spermatogenezo: številčno omejuje populacije zarodnih celic, ki jih še lahko oskrbujejo Sertolijeve celice ter selektivno odstranjuje nenormalne spermije.

Spermiji s kromatinskimi nenormalnostmi imajo pogosto nenormalne oblike glave. Pri njih so bile poročane enoverižne DNK, prelomi DNK, nenormalni prehodi histon-protamin in apoptotske spremembe, kot tudi nezadostna kondenzacija kromatina, nezrelost in jedrne vakuole, ki pa so ultrastrukturne povezave teh okvar. Takšni spermiji imajo zmanjšano oploditveno sposobnost, vodijo v nenormalen razvoj blastocist, neuspešno ugnezditev zarodkov ter so povezani s splavi v prvem trimesečju (Chemes in sod., 2003; Virro in sod., 2004).

Odkloni od genetskih informacij spermijev vključujejo številčne in strukturne kromosomske nenormalnosti. Številčne nenormalnosti vključujejo aneuploidije in poliploidije, ki nastanejo zaradi manjkajočega ali dodatnega kromosoma/ov med mejotskim nerazdruževanjem. Aneuploidije vključujejo avtosome, spolne kromosome ali oboje; poliploidije pa vključujejo povečano število vseh kromosomov. Strukturne kromosomske nenormalnosti vključujejo prelome, vrzeli, translokacije, inverzije, insercije, delecije in acentrične fragmente. Pogostost številčnih kromosomskeh nenormalnosti v semenu neplodnih moških je 1 - 2%, pogostost strukturnih kromosomskeh nenormalnosti pa variira med 7 - 14% (Sun in sod., 2006).

Številne kromosomske nenormalnosti so prisotne v glavah spermijev vseh oblik in velikosti; obratno pa lahko disomni in diploidni spermiji izgledajo popolnoma normalno, z normalno velikima in oblikovanimi glavo in repom. Spermiji z normalno kromosomsko sestavo so prav tako lahko vseh oblik in velikosti, nekateri tudi z nenormalno morfologijo (Celik-Ozenci in sod., 2004).

Kromosomske nepravilnosti (strukturne in številčne) so lahko diagnosticirane s periferno kariotipizacijo. Z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo (PCR) se lahko ugotovi genetske napake, ki so povezane z mutacijami cistične fibroze (pri moških z obstruktivno azoospermijo zaradi prirojene odsotnosti semenovodov) in izbrisala dela kromosoma Y (pri moških s skrajno oligozoospermijo in neobstruktivno azoospermijo zaradi napak spermatogeneze).

Ker se pri spermatogenezi pojavljajo *de novo* aberacije, imajo lahko neplodni moški genetske nenormalnosti spermijev, ki se jih ne odkrije s periferno kariotipizacijo (Oehninger, 2001). Za detekcijo poškodb DNK spermijev se uporabljajo ostale tehnike, kot so barvanje histonov z anilin modrim, metode TUNEL, SCSA in FISH.

Z metodo TUNEL - označevanje fragmentirane DNK s terminalno deoksinukleotidil transferazo in dUTP (označenim) (angl. *TdT (terminal deoxyribonucleotidyl transferase)-mediated dUTP nick-end labeling*) se določi fragmentacija DNK spermijev. TUNEL identificira eno- in dvooverižne DNK zlome tako, da z modificiranimi nukleotidi označi prost 3'-OH konec v encimski reakciji z encimom TdT. TdT katalizira polimerizacijo označenih nukleotidov na 3'-OH konec DNK, ne glede na matrico. Po reakciji se pod fluorescenčnim mikroskopom pregleda pozitivne TUNEL spermije (Franco in sod., 2008).

Določitev enoverižnih (denaturiranih) in dvooverižnih molekul DNK se določi z akridinoranžnim z metodo pregleda kromatinske strukture spermija - SCSA (angl. *Sperm Chromatin Structure Assay*). Spermije se obdela s pufrom, ki zaradi nizkega pH denaturira DNK na mestih verižnih zlomov. Spermije se natoobarva z akridinoranžnim, ki ima metakromatske lastnosti. Barvilo se vrne v nativno, dvooverižno DNK in fluorescira zeleno, v povezavi z enoverižno DNK pa fluorescira rdeče (Evenson in sod., 2006).

Fluorescenčno *in situ* hibridizacijo (FISH) se izvaja z genetskimi označevalci, ki so specifični za določene predele na kromosому ali za celoten kromosom. S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa se z barvnimi filteri simultano določa kromosome, ki fluorescira v različnih barvnih spektrih. Za ugotavljanje aneuploidij se rutinski

simultano določa kromosome, ki so najpogosteje vzrok za spontane splave ali za rojstvo otroka s kromosomskimi nepravilnostmi - to je kromosome 13, 18, 21, X in Y in druge kromosome (Virant - Klun in sod., 2002a).

Analize spermijev po metodi FISH so v semenskem izlivu bolnikov s skrajno OAT v primerjavi s plodnimi moški pokazale večjo pogostost kromosomskih sprememb (Oehninger, 2001). Kromosome spermijev bolnikov, ki imajo teratozoospermijo in astenoteratozoospermijo, imajo 2-3krat povišane številčne nenormalnosti v primerjavi z normalno kontrolo. Pojavnost nenormalnosti spolnih kromosomov narašča z odstotkom morfološko nenormalnih spermijev pri bolnikih z OAT (Sun in sod., 2006).

Metoda FISH je pri neplodnih moških pokazala povišano pojavnost aneuploidije v spermijih kljub normalnemu krvnemu kariotipu, kar nakazuje, da lahko isti faktor, ki povzroča aneuploidijo, inducira tudi teratozoospermijo (Chemes in sod., 2003).

2-3krat večja pogostost aneuploidij spolnih kromosomov je bila najdena v spermijih bolnikov z globozoospermijo. Globozoospermija je zelo redek pojav, najden pri < 1% neplodnih moških, kjer je glavna morfološka nepravilnost odsotnost akrosoma v spermiju. Globozoospermija naj bi bila povezana tudi z nenormalnostmi v kromatinski strukturi, saj so pri teh bolnikih našli povišano frekvenco prelomov DNK.

Med morfološkimi nenormalnostmi in sestavo kromosomov obstaja povezava. Pri teratozoospermikih z visokim odstotkom makrocefalnih, večjedrnih in večrepnih spermijev je bila prav tako najdena visoka frekvanca aneuploidij in poliploidij. Pri bolnikih z OAT s 100% makrocefalnimi glavami spermijev, ki so imeli 2 - 5 repov, je bilo poročano o diploidiji, triploidiji, kvadriploidiji in hiperploidiji. Visoka frekvanca disomij kromosomov 18, X ali Y pri 100% teratozoospermikih je bila povezana z dvojnimi glavami, velikimi večjedrnimi spermiji in večrepimi spermiji. Poročali so tudi o 20% disomiji in 10% diploidiji pri neplodnih moških z makrocefalnimi ali dvorepimi spermiji (Sun in sod., 2006).

Mitohondrijska DNA spermija je majhna, krožna DNA, ki ni vezana na posebne proteine. Gibljivost spermija je povezana z mitohondrijskim volumnom znotraj srednjega dela spermija. Mitohondrijska DNA kaže visoko stopnjo mutacij in delecij, ki so povezane z zmanjšano gibljivostjo spermijev. Mitohondrijska DNA se deduje po materini strani; samo v 1% primerov je bil poročan prenos mutacij iz očetove mitohondrijske DNA (Ozmen in sod., 2007).

## 2.2.4 Otroci rojeni po postopku ICSI

Znano je, da je postopek ICSI povezan s povišanim, vendar vseeno nizkim rizikom prirojenih razvojnih nepravilnosti in genetskimi ter epigenetskimi nenormalnostmi pri otrocih. Tveganje prirojenih razvojnih nepravilnosti, tako manjših kot večjih, je bistveno večje pri otrocih, spočetih po postopku ICSI, kot pri naravno spočetih otrocih. Prevladovanje *de novo* kromosomskih nenormalnosti je večje pri otrocih, spočetih po postopku ICSI, kot pri naravno spočetih. Epigenetske nenormalnosti, kot so napake v metilaciji DNK, so povezane z določenimi genetskimi boleznimi (Beckwith-Wiedmann in Angelman sindrom), in kljub temu, da so splošno redke, vseeno malenkostno prevladujejo pri otrocih, spočetih po ICSI, v primerjavi z naravno spočetimi (Franco in sod., 2008).

Moška neplodnost se veže na nekatere genetske nepravilnosti. Predvsem pri moških z azoospermijo in skrajno oligozoospermijo so pogosteje nepravilnosti kromosoma Y (npr. mikrodelecije kromosoma Y) in translokacije nespolnih kromosomov. Pri moških z azoospermijo je verjetno, da se bodo s postopkom ICSI prenesle nepravilnosti kromosoma Y na moškega potomca. Pri neplodnih moških je povečana verjetnost mutacije gena za cistično fibrozo, predvsem pri moških s prirojeno odsotnostjo semenovodov (pomanjkljivost CBAVD). V zadnjem času se izvaja postopek ICSI tudi pri bolnikih s sindromom Klinefelter (47, XXY), če se v modu dobijo spermiji (Virant - Klun in sod., 2002a).

Pri perinatalnem kariotipu ploda po postopku ICSI se pri 1,2% primerov odkrije *de novo* nenormalnosti na spolnih kromosomih, kar je petkrat več kot pojavnost v neselekcionirani neonatalni populaciji, kar se lahko razloži kot večje pojavljanje disomij spolnih kromosomov in nulisomov v spermijih bolnika OAT (Van Steirteghem, 1997). 80% *de novo* strukturnih kromosomskih aberacij je posledica prenesenih kromosomskih aberacij iz neplodnega očeta (Fernandez-Gonzalez in sod., 2008).

Iz raziskav IVF-ET je dobro znano, da so nosečnosti, dosežene s pomočjo OBMP, podvržene velikim problemom, kot so prezgodnje rojstvo, nizka teža novorojenca in povišana prenatalna smrtna stopnja zaradi večje pojavnosti večplodne nosečnosti. Pričakovani prehiter porod, nizka teža ob rojstvu in stopnja perinatalne smrtnosti pri enojčkih na splošno je 5,2%, 4,8% in 7,1%; v primeru ICSI pa 9,9%, 9,8% in 15,7%, kar predstavlja negativen vpliv neznanih faktorjev na izid nosečnosti po OBMP (Aytoz in sod., 1998). Zato se v zadnjem času v programu OBMP v maternico prenaša 1 sam zarodek, nadstevilne zarodke pa se zamrzne (Virant - Klun, 2009).

Do sedaj ni bilo pojasnjeno, ali predstavlja riziko glede varnosti ICSI sam postopek ICSI ali pa določeni dejavniki staršev. Zadnje izgleda bolj verjetno, saj je riziko prirojenih razvojnih nepravilnosti med otroci, rojenimi po klasičnem IVF in ICSI postopku, podoben. Riziko večjih prirojenih razvojnih nepravilnosti po ICSI je enak pri enojčkih, dvojčkih in trojčkih in ni odvisen od indikacije za ICSI (OAT, obstruktivna/ neobstruktivna azoospermija, neuspešen prejšnji IVF izid, ostalo) (Ludwig in sod., 2003).

Zgodnji nosečniški izid po postopku ICSI se ne razlikuje glede na izvor spermijev (iz semenskega izliva, mod ali obmodka). Pogostost znotrajmaternične smrti pa je statistično

značilno višja v primeru, če se za postopek ICSI uporabi seme oz. spermije, ki imajo okvarjena vsaj dva parametra (nizka koncentracija ( $< 5 \times 10^6$  spermijev/ ml), slaba progresivna gibljivost ( $< 20\%$ ), slaba morfologija ( $\leq 4\%$ )), kot pa v primeru, če je okvarjen samo en parameter semena (Aytoz in sod., 1998). Morfologija spermija je zagotovo pomembna za razvoj zarodka, vendar pa se lahko tudi s spermijem, ki ima morfološko nepravilno glavo, rodi normalen otrok (Gómez in sod., 2000).

Resnejše tveganje za večje prijene razvojne nepravilnosti (povzročajo funkcionalne poškodbe ali pa zahtevajo operativne popravke) pri otrocih, spočetih po postopku ICSI, obstaja za srce, prebavni trakt in notranji urinarni trakt (Katalinic in sod., 2004).

V naravi v jajčno celico vstopi samo glava spermija s centriolom. ICSI pa je metoda, s katero v jajčno celico injiciramo cel spermij, vključno z mitohondrijsko DNK. Obstajal je strah, da bo to povečalo pojav presnovnih obolenj pri otrocih, spočetih s postopkom ICSI, vendar to do danes ni bilo dokazano (Virant - Klun, 2009).

Poudariti je potrebno, da se populacija staršev otrok, spočetih po postopku OBMP, razlikuje od splošne populacije po višji starosti in neplodnosti partnerjev (Virant - Klun in sod., 2002a).

Pari, ki gredo skozi postopek ICSI, morajo biti obveščeni o večjem tveganju za prenosljive kromosomske aberacije, o povečanem tveganju *de novo* aberacij na predvsem spolnih kromosomih in o tveganju prenosa problemov plodnosti na potomce (Van Steirteghem, 1997).

## 2.3 IMSI

Na podlagi vsega do sedaj povedanega vidimo, da je selekcija morfološko normalnih spermijev za izid postopka ICSI zelo pomembna. Tukaj se kaže potencialen pomen IMSI.

### 2.3.1 Postopek IMSI

Klasični pristop pri odkrivanju moške plodnosti in neplodnosti je bil do nedavnega svetlobni mikroskop, ki pa ima dve pomanjkljivosti. Prvič, svetlobni mikroskop je omejen z optiko in zato omogoča le majhno povečavo; in drugič, uporaba svetlobnega mikroskopa omogoča le opazovanje površine. Svetlobni mikroskop daje sicer dobro predstavo o številu spermijev, njihovi gibljivosti in topografskih elementih morfologije, ne daje pa nobene ocene o anatomiji ali celičnih organelih, ki pa so najpomembnejši elementi plodnosti spermija (Bartoov in sod., 1994).

Finih okvar organelov spermija, ki so lahko povezane z izidom ICSI, embriolog ne more opaziti pri 200 - 400kratni povečavi pod svetlobnim mikroskopom (Bartoov in sod., 2002). Zato je Bartoov leta 2002 razvil nov sistem za selekcijo spermijev pod veliko povečavo. Metodo so poimenovali *Motile Sperm Organellar Morphology Examination*, MSOME, pri kateri se pod ~6100-kratno povečavo opazuje neobarvane spermije. Ker je MSOME citološka tehnika, pri kateri se ne uporablja barvil, lahko z njo s pomočjo mikromanipulacijskega sistema pridobimo en spermij z normalno morfologijo (slika 12) in ga injiciramo v jajčno celico (Bartoov in sod., 2003).

Kriterij MSOME za izbor spermija je bil izdelan na podlagi prejšnjih raziskav ultramorfoloških študij, v katerih so primerjali spermije plodnih in neplodnih moških na podlagi SEM (da informacijo o zunanji strukturi glave spermija) in TEM (da 2D notranjo informacijo o karioplazmi) mikroskopije (Bartoov in sod., 1994, 2003). V vsakem vzorcu semena so ocenjevali šest celičnih organelov: akrosom, postakrosomalno lamino, vrat, mitohondrije, rep in jedro. Prvih 5 organelov je bilo določenih za morfološko normalne oz. nenormalne na osnovi prisotnosti določenih nepravilnosti (preglednica 3). Od šestih celičnih organelov spermija je samo morfološka normalnost jedra spermija (oblika + kromatinska vsebnost) bistveno korelirala s stopnjo oploditve (Bartoov in sod., 1994).

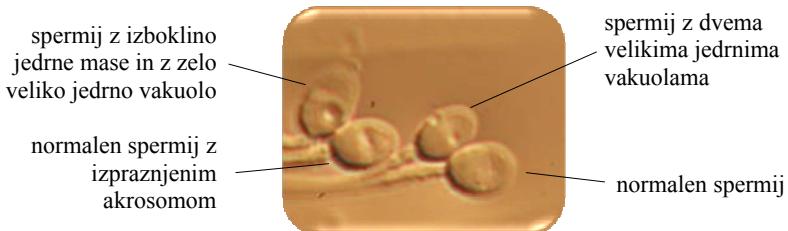
**Preglednica 3: Specifične morfološke nepravilnosti celičnih organelov spermija, opazne z metodo MSOME** (Bartoov in sod., 1994)

	Celični organeli spermija						
	akrosom	postakrosomalna lamina	jedro		vrat	rep	mitohondriji
			oblika*	kromatinska vsebnost			
<b>Specifična nepravilnost</b>	odsoten delni vezikuliran	odsotna vezikulirana	majhno ovalno, veliko ovalno, ozko ( $<2,9\mu\text{m}$ v širino), široko ( $>3,7\mu\text{m}$ v širino), kratko ( $<4,2\mu\text{m}$ v dolžino), regionalne okvare	površina vakuol $>4\%$ celotne jedrne površine	izven osi neorganiziran citoplazmatski ostanek	odsoten zvit zlomljen več repov kratek	odsotni delni neorganizirani

\*spermiji s koničasto, okroglo, amorfno, stožasto ali večjedno glavo so izključeni

### MSOME kriterij

Normalno oblikovana glava spermija je gladke, simetrične in ovalne oblike (izbokline in ugreznitve jedrne mase so definirane kot regionalne nepravilnosti glave), homogen jedrni kromatin pa ne vsebuje več kot eno vakuolo, ki predstavlja manj kot 4% površine glave. Povprečna dolžina glave spermija je  $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$  in širina  $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$  (Bartoov in sod., 2003).



Slika 12: Morfološko normalni in nenormalni spermiji po kriteriju MSOME; 6000-kratna povečava.

Morfološko stanje jedra je določeno tako po obliku kot po homogenosti kromatina. MSOME se izvaja samo na gibljivih spermijih. Nekatere morfološke okvare, kot so velike vakuole v glavi, se lahko razkrijejo šele med gibanjem spermija, zato je gibljivost lahko prednost pri ocenjevanju morfologije (Berkowitz in sod., 2006).

Na sterilno posodo s steklenim dnem se pod sterilno parafinsko olje naredi tanke mikrolitrskie kapljice iz prečiščenih spermijev in 0 - 8% PVP medija, ki upočasni njihovo gibanje. Tako pripravljene spermije se pod 100-kratnim imerzijskim objektivom oceni po MSOME kriteriju s pomočjo invertnega mikroskopa, opremljenega z Nomarski diferencialnimi interferenčnimi kontrastnimi lečami (DIC). Skupna povečava je približno 6600-kratna. Izbrane morfološko normalne spermije se uporabi za ICSI pod 200 - 400kratno povečavo.

Vnos enega gibljivega spermija z normalno morfologijo glave v citoplazmo jajčne celice so poimenovali *Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection (IMSI)*, slov. neposredni vnos **morfološko** izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice.

Stopnja ugnezditve in nosečnosti po postopku IMSI je bistveno višja v primerjavi s postopkom ICSI, stopnja splava pa je bistveno nižja v primerjavi s postopkom ICSI. Po postopku IMSI je moč doseči nosečnost pri parih, ki imajo za sabo že prejšnje neuspele poskuse ICSI. Stopnja nosečnosti po postopku IMSI je 66%, stopnja splava 9%; klasični postopek ICSI pa ima stopnjo nosečnosti med 30 in 45% in stopnjo splava 33% (Bartoov in sod., 2003).

Preglednica 4: Primerjava med izidi postopkov IMSI in ICSI (Bartoov in sod., 2003)

Izid	Kontrola (n=50)		Poskus (n=50)	
	prejšnji ICSI	trenutni ICSI	prejšnji ICSI	trenutni IMSI
Izseseane (aspirirane) JC	$13,3 \pm 5,2$	$13,2 \pm 5,9$	$13,4 \pm 5,5$	$13,6 \pm 5,8$
Injicirane JC	$10,3 \pm 4,7$	$10,2 \pm 5,5$	$10,1 \pm 4,6$	$10,6 \pm 4,4$
Stopnja oploditve (%)	$63,7 \pm 18,9$	$65,5 \pm 21,5$	$63,1 \pm 25,3$	$64,5 \pm 17,5$
% zarodkov najboljše kakovosti	$31,1 \pm 16,4$	$31,0 \pm 19,5$	$31,7 \pm 21,6$	$45,2 \pm 28,2$ b,c
Prenos zarodkov	$3,6 \pm 1,1$	$3,5 \pm 1,2$	$3,6 \pm 1,2$	$3,8 \pm 1,1$
Stopnja ugnezditve (%)	—	$9,5 \pm 15,3$	—	$27,9 \pm 26,4$ c

b Statistično značilno različen od prejšnjega ICSI postopka ( $P \leq 0,01$ ).

c Statistično značilno različen od trenutnega ICSI postopka ( $P \leq 0,01$ ).

Po postopku ICSI je preživetje zarodka v maternici povezano s finim morfološkim stanjem jedra spermija. Zato postopek IMSI, ki izključno temelji na selekciji spermijev brez morfoloških nepravilnosti, vodi v višjo stopnjo nosečnosti (Bartoov in sod., 2003). Bistveno nižji stopnji ugnezditve in nosečnosti so posledica prenosa zarodkov, nastalih iz morfološko nenormalnih spermijev. Razmerje med individualno morfologijo ter stopnjo ugnezditve in nosečnosti najverjetneje bazira ne skritih okvarah na kromosomskem nivoju zarodka, ki jih prispeva spermij (De Vos in sod., 2003).

Na verjetno povezavo med nenormalnostmi kromatina spermija in morfološkim stanjem jedra spermija, definiranega po kriteriju MSOME, nakazuje tudi dejstvo, da so ICSI-odporni pari zanosili že po enem samem postopku IMSI brez bistvene spremembe v stopnji oploditve med prejšnjim ICSI in trenutnim IMSI postopkom (Bartoov in sod., 2003).

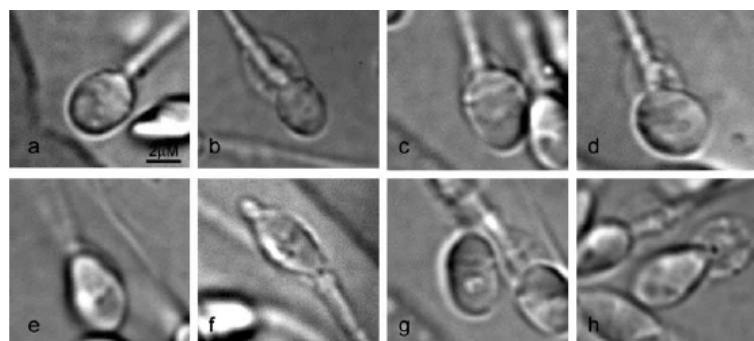
Med izidi IMSI in osnovnimi rutinskimi lastnostmi semena ni bilo najdene nobene povezave, saj nekaj spermijev brez jedrnih nenormalnosti, izbranih pred injekcijo, ne predstavlja celotne populacije spermijev v semenskem izlivu. Pomembno je poudarit, da je rutinska preiskava narejena na celotnem vzorcu, medtem ko se MSOME izvede le na gibljivih spermijih (Bartoov in sod., 1994, 2003).

V primeru, da je seme morfološko tako slabe kakovosti, da ni moč najti spermija z normalnim jedrom, se izbere drugi najboljši morfološko ocenjen spermij (angl. *second choice*) z minimalnimi nenormalnostmi jedra.

#### **Druge najboljše izbire so:**

- spermij z nenormalnimi, vendar ovalnimi oblikami jedra in morfološko normalno vsebnostjo jedrne vsebine so *prva izbira* (majhne ali velike ovalne oblike jader) (slika 13b in c),
- spermij z neovalnimi, nenormalnimi oblikami jedra ter normalno jedrno vsebino, so *druga izbira* (široke ali suhe oblike) (slika 13d in e),
- spermiji z regionalnimi nepravilnostmi oblike jedra (izbokline ali vdolbine jedrne mase) so *trečja izbira* (slika 13f).

Spermije z velikimi vakuolami, ampak normalno ovalno obliko jedra (slika 13g) se raje izbere kot tiste z nespecifičnimi kombiniranimi jedrnimi nenormalnostmi (ozke oblike + velike vakuole (slika 13h)). Kot pri običajnem ICSI pa se spermije s koničasto, amorfno, stožčasto, okroglo obliko glave ali večjedrno glavo popolnoma izloči (Berkowitz in sod., 2005).



Slika 13: Spermiji druge izbire: (a) z morfološko normalnim jedrom; (b) majhna ovalna oblika jedra; (c) velika ovalna oblika jedra; (d) široka oblika jedra; (e) ozka oblika jedra; (f) regionalna nepravilnost jedra; (g) ovalna jedrna oblika + velike jedrne vakuole; (h) nenormalna oblika jedra + velike vakuole (Berkowitz in sod., 2005).

Stopnja oploditve, odstotek zarodkov najboljše kakovosti in stopnja ugnezditve so bistveno višje, če se injicira spermije z normalno morfologijo jedra kot pa spermije druge izbire. Stopnja nosečnosti, dosežena z normalno morfologijo jedra spermija, je višja (58,6%), stopnja splava pa bistveno nižja (9,8%) kot pri spermijih druge izbire (stopnja nosečnosti 25,7%; stopnja splava pa 33%).

Spermiji z večkratnimi nespecifičnimi jedrnimi nenormalnostmi namreč odražajo obsežnejše kromosomske nepravilnosti v primerjavi s tistimi z eno specifično nenormalnostjo. Obstoj velikih vakuol v jedru spermijev kaže na večje poškodbe jedrne DNK v primerjavi s poškodbami DNK pri nepravilnih velikostih in oblikah jedra spermija. Med velikostjo jedrnih vakuol in kromatinsko stabilnostjo obstaja statistično značilna negativna povezava. Ker kromatinska stabilnost vpliva na razvoj zarodka, se raje izbira spermije z enojnim odklonom od oblike oz. velikosti kot pa tiste z normalno jedrno obliko in poškodovano vsebino. Od specifičnih jedrnih nenormalnost z normalno jedrno vsebino se raje izbira spermije z ovalno jedrno obliko (ali velike ali male) kot pa neovalne oblike, saj izgleda, da spermiji z velikimi/ majhnimi glavami ne vsebujejo kromosomskih aberacij.

Spermij z morfološko nenormalnim jedrom ima ponavadi slabo oploditveno sposobnost, vendar so nekateri spermiji z določenimi jedrnimi nenormalnostmi še vedno sposobni doseči oploditev in nosečnost po postopku ICSI. Tudi s spermiji druge izbire, ki imajo eno specifično nepravilnost, se lahko rodijo otroci. Mikroinjekcija spermija z morfološkimi nenormalnostmi jedra se pogosto konča s splavom, sploh če se uporabi spermije z velikimi vakuolami (Berkowitz in sod., 2005).

Cassuto in sod. (2008) je za izbor spermija za vnos v jajčno celico izdelal HAVBIC ocenjevalni kriterij. V raziskavi je pod 400-kratno povečavo izbral spermij, ga pred injeciranjem v jajčno celico morfološko ocenil pod visoko, 6100-kratno povečavo, ter spremljal njegov zgodnji razvijajoči se zarodek.

### **HAVBIC klasifikacija**

Pri vsakem spermiju se oceni 6 parametrov, ki so jih poimenovali HAVBIC (slov. GAVBIC): **Glava**, **Akrosom**, **Vakuole**, **Baza**, **Insercija** (vsaditev repa) in **Citoplazmatski ostanek**.

- **H(G) - glava**

Ocenjuje se normalna oblika in velikost glave v obeh ravninah glede na merila SZO. Normalna oblika glave je definirana kot ovalna oblika s pravilnim robom; dolžina glave 3 do 5 µm, širina 2 do 3 µm. Oceni se kot 3 za normalnost v dveh ravninah, 1 kot normalnost v eni ravnini in 0 kot nenormalnost v obeh ravninah.

- **A - akrosom**

Ocenjuje se prisotnost ali odsotnost in kakovost akrosoma, ki se meri glede na akrosomsko kapo, ki prekriva več kot 1/3 površine glave. Prisotnost akrosoma je ocenjena z 1, odsotnost z 0.

- **V - vakuole**

Ocenjuje se prisotnost ali odsotnost in kakovost vakuol v glavi spermija. Odsotnost vakuol se oceni z 2; ena sama vakuola z majhnim premerom se oceni z 1, ostale možnosti pa z 0.

- **B - baza glave**

Ocenjuje se baza glave spermija (preglednica 6 - puščica). Baza se oceni glede na obliko: normalna baza se oceni z 2, nenormalna z 0.

- **I - vsaditev repa (insercija)**

Ocenjuje se ravninska pozicija repa. Normalna se oceni z 1, nenormalna z 0.

- **C - citoplazmatski ostanek**

Ocenjuje se prisotnost oz. odsotnost. Odsotnost se oceni z 1, prisotnost z 0.

Če se oceni spermije po tem kriteriju, se lahko za popolnoma normalen spermij po seštevku vseh točk dobi največ 10 točk. Nepravilnosti v vsakem gibljivem spermiju nato znižajo točke od 10 proti 0.

Ocenjene spermije se razdeli v (preglednica 6):

- razred I: spermiji z normalno glavo in maksimalno dvema drugima nepravilnostma, ki nista locirani v glavi
- razred II: spermiji z več kot dvema nepravilnostma
- razred III: spermiji z več nepravilnostmi glave

Injekcija spermija z višjo klasifikacijo vodi v višjo stopnjo oploditve (preglednica 5).

**Preglednica 5: Stopnja oploditve, razvoja zarodkov in razvoj blastocist glede na tri razrede spermijev po Cassuto-Barak klasifikacijsi.** V stopnji razvoja blastocist med tremi skupinami zarodkov, ki so nastali iz spermijev razredov I, II in III, obstaja razlika, kar podpira pomembnost morfologije spermija na razvoj zarodka (Cassuto in sod., 2008).

	Razred spermija po Cassuto-Barak klasifikaciji			skupaj spermijev N=218
	razred I 21% (46/218)	razred II 59% (128/218)	razred III 20% (44/218)	
Stopnja oploditve	84% (39/46) <sup>a</sup>	73% (94/128) <sup>a</sup>	61% (27/44) <sup>a</sup>	73% (160/218)
Stopnja blastocist in morul skupaj	37% (17/46)	26% (33/128)	16% (7/44)	26% (57/218)
Stopnja povsem razvitih blastocist	15% (7/46) <sup>b</sup>	9% (12/128) <sup>b</sup>	0% (0/44) <sup>b</sup>	33% (19/57)

a statistično značilna razlika opazna pri stopnji oploditve med tremi razredi ( $P < 0,04$ )

b visoka statistično značilna razlika pri stopnji razvitosti blastocist med razredom 1 in 3 ( $P < 0,007$ ), med razredom 2 in 3 ( $P < 0,03$ ) in razredoma 1+2 in skupino 3 ( $P < 0,02$ ); ne pa med razredoma 1 proti 2+3.

Casutto je razvil tudi bolj praktični kriterij za vseh 6 HAVBIC parametrov, imenovan **Cassuto-Barak klasifikacija**. Pri statistični obdelavi kriterija HAVBIC ni bilo statistično značilne povezave med stopnjo oploditve, kakovostjo zarodka ter njegovega razvoja in morfologijo glave, akrosoma, citoplazmatskega ostanka in vsaditev repa spermija. HAVBIC sistem pa jasno kaže, da vakuole v glavi spermija poslabšajo oploditev že od prvega koraka, saj je bila višja stopnja oploditve dobljena pri jajčnih celicah, ki so bile injicirane s spermiji brez vakuol v glavi. Vakuole različnih velikosti so povezane z integriteto DNK spermijev in lahko zato vplivajo na oploditveno sposobnost spermijev. Baza glave spermija, kjer se nahaja del jedra in centriol, je eden pomembnejših parametrov za kakovost spermija, saj normalnost baze prispevala h kakovosti zarodka. Pomembnost oblike glave in njena normalnost je prav tako dobro znana, saj med normalno obliko glave spermija in stopnjo oploditve obstaja pozitivna povezava.

Pri Cassuto-Barak klasifikaciji se torej ocenjujejo trije parametri spermija: vakuole, glava in baza; ocenjene so z 1 = normalno in 0 = nenormalno. Če se to primerja s HAVBIC ocenjevanjem, potem 0 ostane 0, vse ostale vrednosti pa se ocenijo z 1. Formula za ocenitev morfologije spermija je naslednja:

Ocenitev spermija =  $(1,277 + 1,977 \times \text{glava}) + (2,746 \times \text{vakuole}) + (1,08 \times \text{baza glave})$   
Za bolj praktično obliko te formule za uporabo med opazovanjem spermijev pred injekcijo so številke v formuli zaokrožili. Formula je bila spremenjena v :

### Ocenitev morfologije spermija = (2 x ocena glave) + (3 x ocena vakuol) + (ocena baze)

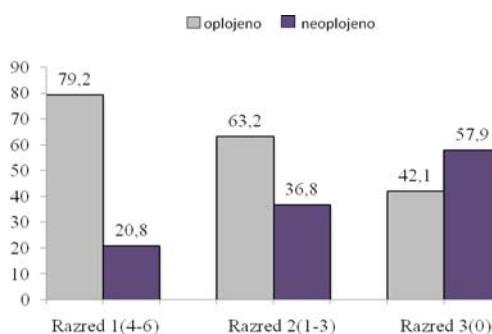
Vrednosti ocenjevanja po tej formuli so od 0 do 6. Spermije lahko na ta način razdelimo v tri razrede (preglednica 6):

- **razred I** - visoko kakovostni spermiji z oceno od 4 do 6
- **razred II** - spermiji srednje kakovosti z oceno od 1 do 3
- **razred III** - slaba kakovost spermijev z oceno 0.

**Preglednica 6: Spermiji treh razredov po HAVBIC in Cassuto-Barak klasifikaciji** (Cassuto in sod., 2008)

Ocene spermijev			
HAVBIC klasifikacija	10	5 (normalna glava, akrosom in rep)	2 (ni citoplazmatskega ostanka in normalen rep)
Cassuto - Barak klasifikacija	6	2 (normalna glava)	0
		Po injekciji tega spermija se je na 3. dan razvil zarodek povprečne kakovosti, ki pa se na 5. dan gojenja ni razvil do blastociste.	Po doseženi oploditvi s tem spermijem ni prišlo do razvoja do blastociste.
Razred I			
Razred I Razred II Razred III			

Po injekciji spermijev razreda I po Cassuto-Barak klasifikaciji je bila dobljena stopnja oploditve 79,2%, 63,2% po injekciji spermijev razreda II, in 42,1% s spermiji razreda III (slika 14).

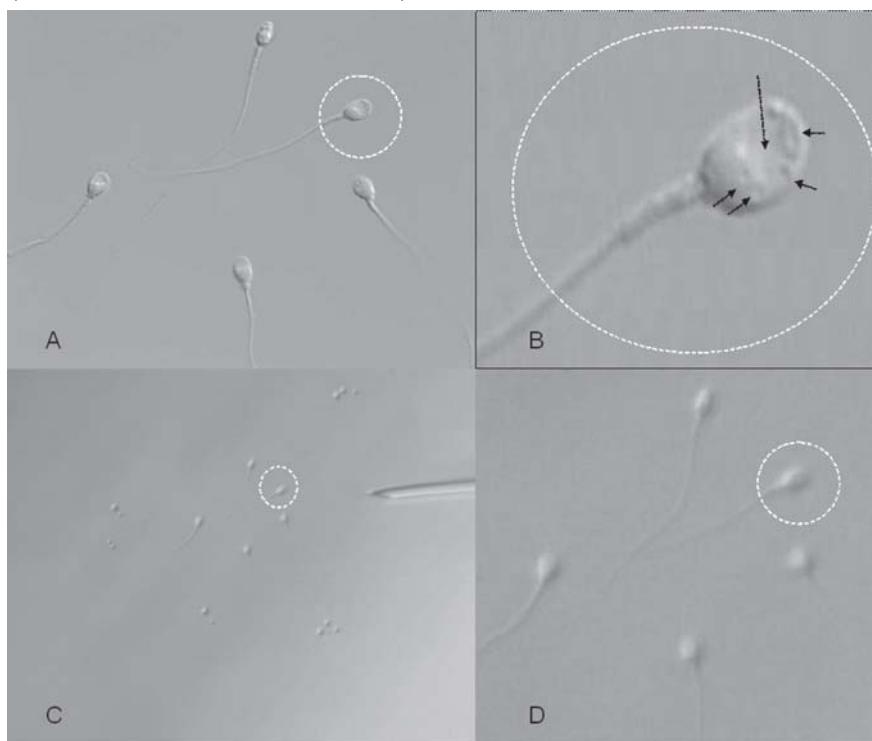


Slika 14: Stopnja oploditve s spermiji treh razredov po Cassuto-Barak klasifikaciji (Cassuto in sod., 2008).

Statistična analiza povezave ženske starosti in ocene injiciranega spermija se je razlikovala v kakovosti zarodkov, ki so nastali iz jajčnih celic žensk mlajših od 30 let in tistih iz žensk starejših od 30 let. S starostjo povezano padanje kakovosti jajčnih celic je znan pojav. Ocenjevanje spermija je zelo pomembno predvsem v primerih jajčnih celic žensk starih več kot 30 let. Pri injekciji spermija razreda II ali III je bilo razvitih manj zarodkov dobre kakovosti v starejši skupini žensk v primerjavi z mlajšo. V starejši skupini žensk je zato dobro, da se izbere dobra jajčna celica, če jo injiciramo z morfološko slabim spermijem. Jajčne celice mlajših žensk so namreč sposobne popravljati DNK injiciranega spermija. Ko je injiciran spermij razreda I, je s starostjo povezana kakovost jajčne celice nepomembna, saj dobri spermiji ne potrebujejo popravila; v tem primeru ni bilo opazne nobene razlike, ko je bila stopnja visoko kakovostnih zarodkov primerjana med mlajšimi in starejšimi ženskami (Cassuto in sod., 2008).

Priporočljiva ocena spermija za vnos v jajčno celico je od 4 do 6. Pri mlajših ženskah to ocenjevanje ni tako odločilno. To tehniko ocenjevanja spermijev in sledečo injekcijo je Cassuto poimenoval *Scored Intra Cytoplasmic Sperm Injection* (SICSI), neposredni vnos **ocenjenega** spermija v citoplazmo jajčne celice (Cassuto, 2009).

Tudi po obsežnem iskanju pod ~ 6000-kratno povečavo pogostost detekcije spermija z normalno morfologijo ali vsaj z dvema majhnima vakuolama močno variira glede na vzorec semena. V več kot 50% primerov ni možna selekcija spermija brez nepravilnosti. Če na istem vzorcu semena izvedemo selekcijo z uporabo klasičnega postopka ICSI in postopka IMSI, je verjetnost izbora normalnega spermija veliko manjša pri 400-kratni povečavi kot pa pri 6000-kratni povečavi. Za izbor spermija brez napak je verjetnost z uporabo sistema ICSI med 50 do 67%. Kakorkoli, ko izberemo spermij direktno s sistemom IMSI, je verjetnost izbora normalnega spermija 100% (slika 15) (Vanderzwalm en sod., 2008).



Slika 15: Spermiji, vidni pod Nomarski in Hoffman optičnim sistemom pod različnimi povečavami. (A) Nomarski diferencialni interferenčni kontrast -DIC pri 1000-kratni povečavi (100-kratni DIC objektiv). (B) Nomarski DIC pri 12000-kratni povečavi (100-kratni DIC objektiv + VarioC-mount Zoom). (C) Hoffman modulacijski kontrast pri 400-kratni povečavi (40-kratni HMC objektiv). (D) Hoffman modulacijski kontrast pri 1000-kratni povečavi (40-kratni HMC objektiv + VarioC-mount Zoom). Kratka puščica - majhna vakuola, dolga puščica - velika vakuola (Vander - zwalmen in sod., 2008).

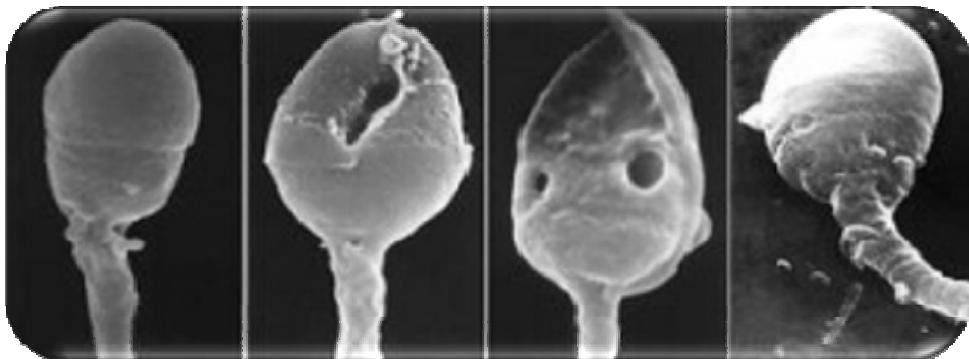
### 2.3.2 Vakuole in DNK poškodbe

Oploditvena sposobnost spermija, razvoj zarodka in zgodnji splav so odvisni od integritete in funkcije različnih struktur spermija, predvsem pa od DNK spermija (Garolla in sod., 2008).

Trditev, da jajčna celica priskrbi ves primarni material (proteini in RNA) in da spermij in njegova DNK igrata samo sekundarno vlogo, mora biti ponovno preverjena. Spermij vsebuje skoraj 3000 različnih molekul mRNA, od katerih nekatere vsebujejo kodo za proteine, ki so potrebni za razvoj zarodka (Vanderzwalmen in sod., 2008).

ICSI zarodki imajo kljub uporabi normalno izgledajočega spermija za injekcijo bistveno manjšo stopnjo razvoja do razvojne stopnje blastociste v primerjavi z razvojem zarodkov po klasičnem IVF postopku. Težava je v tem, da se za injekcijo pri ICSI lahko izbere spermij z jedrnimi vakuolami. Pri klasičnem IVF postopku igra cona pelucida (ZP) selektivno pregrado za nenormalne spermije, tako da lahko v večini primerov samo normalni spermiji oplodijo jajčno celico. Spermiji, ki se vežejo na humano ZP, so visoko selektivni za dvoverižne DNK. Vezava spermija s ZP namreč igra pomembno vlogo pri selekciji spermija z normalno gibljivostjo in morfologijo, kot tudi normalno DNK (Liu in sod., 2007). Pri postopku ICSI je pregrada ZP preolomljena, subjektivna ocena embriologa pri 400-kratni povečavi pa lahko poviša verjetnost injiciranja spermija z vakuolami. Klub temu, da so nekatere morfološke nepravilnosti lahko opazne pri 400-kratni povečavi, so lahko druge opazne samo z uporabo posebne optične opreme. Vpeljava Nomarski optike omogoča vidljivost vakuol v glavi spermija, ki so drugače nevidne z uporabo 400-kratne povečave s Hoffman modulacijskim kontrastom (Vanderzwalmen in sod., 2008; Berkowitz in sod., 2006).

Poškodbe DNK ne morejo biti direktno ocenjene na spermijih, ki so izbrani za postopek IMSI. Resolucijska moč, ki jo ponuja ta sistem, pa omogoča, da se lahko izloči spermije z jedrnimi vakuolami, ki se jih z običajnim sistemom ICSI ne more opaziti. Prisotnost vakuol je najverjetneje odsev molekularnih okvar, ki so odgovorne za nenormalno preoblikovanje kromatina med zorenjem spermija, kar lahko povzroči, da je spermij bolj nagnjen k poškodbam DNK. Izločitev teh spermijev lahko zmanjša verjetnost injiciranja nenormalnega spermija v jajčno celico (Hazout in sod., 2006).



Slika 16: Vrstična elektronska mikroskopija spermijev; skrajno levo in desno sta normalna spermija, v sredini pa spermija z vakuolami (Jedrne vakuole, 2008).

Mnogo študij je pokazalo, da obstaja povezava med poškodbo kromatina oz. DNK spermija in prisotnostjo jedrnih vakuol (Berkowitz in sod., 2006b; Gopalkrishnan in sod., 2000; Franco in sod., 2008; Vanderzwalmen in sod., 2008, Hazout in sod., 2006).

Pokazano je bilo tudi, da imajo spermiji z normalno morfologijo (akrosom, glava, rep, vrat) brez vakuol boljše fiziološko stanje mitohondrijske funkcije, integritete DNK in fragmentacije DNK kot spermiji z normalno morfologijo in vsaj eno vakuolo v glavi. FISH analize na oligozoospermikih so pokazale, da v skupini normalnih spermijev brez vakuol ni aneuploidij (Garolla in sod., 2008).

Primeri, kjer vsi spermiji znotraj semenskega izliva razvijejo velike jedrne vakuole so zelo redki (3% ICSI populacije). Po drugi strani pa je MSOME razkril, da je v semenskem izlivu moških, ki so rutinsko napoteni na postopek ICSI, približno 30 - 40% spermijev z vakuoliziranimi jedri. Te okvare, ki predstavljajo riziko za nosečnost, lahko s standardno selekcijo pred ICSI ostanejo neopažene in imajo zato 30% možnosti, da se jih izbere za mikroinjekcijo.

Za veliko jedrno vakuolo se smatra prosojna vakuola z mejami premera  $0,78 \pm 0,18 \mu\text{m}$ . Če se za injekcijo uporabi spermij z veliko jedrno vakuolo, ker normalnega ni moč najti, je stopnja nosečnosti bistveno nižja, stopnja splava pa bistveno višja v primerjavi z injekcijo normalnega spermija (18% proti 50% in 80% proti 7%), kar potrjuje, da je morfologija spermija bistvena za nosečnost, kadar se uporabi postopek ICSI. V primerih spermijev z normalno obliko jedra in velikimi vakuolami je embrionalni razvoj na začetku normalen (normalna oploditev, razvoj zarodkov najboljše kakovosti, ugnezditev), vendar pa je poslabšano preživetje zarodkov v poznejših stopnjah (nizka stopnja nosečnosti, visoka stopnja splava) (Berkowitz in sod., 2006b). Do enakih ugotovitev so prišli tudi Bar-Chama in sod. (2007) pri klasičnem IVF postopku (preglednica 7).

**Preglednica 7: Izidi klasičnega IVF postopka glede na vakuoliziranost spermijev** (Bar-Chama in sod., 2007)

% vakuoliziranosti spermijev	Starost ženske	Stopnja oploditve	Stopnja klinične nosečnosti	Stopnja splava
0%	$34,6 \pm 5,4$	57,1%	47,9% (499/1043)	<b>14,8%</b> (74/499)*
1-4%	$34,5 \pm 1,2$	57,2%	43,6% (88/202)	14,8% (13/88)
$\geq 5\%$	$34,3 \pm 1,2$	55,8%	37,3% (19/51)	<b>36,8%</b> (7/19)*

\* razlike so statistično značilne pri  $P < 0,05$

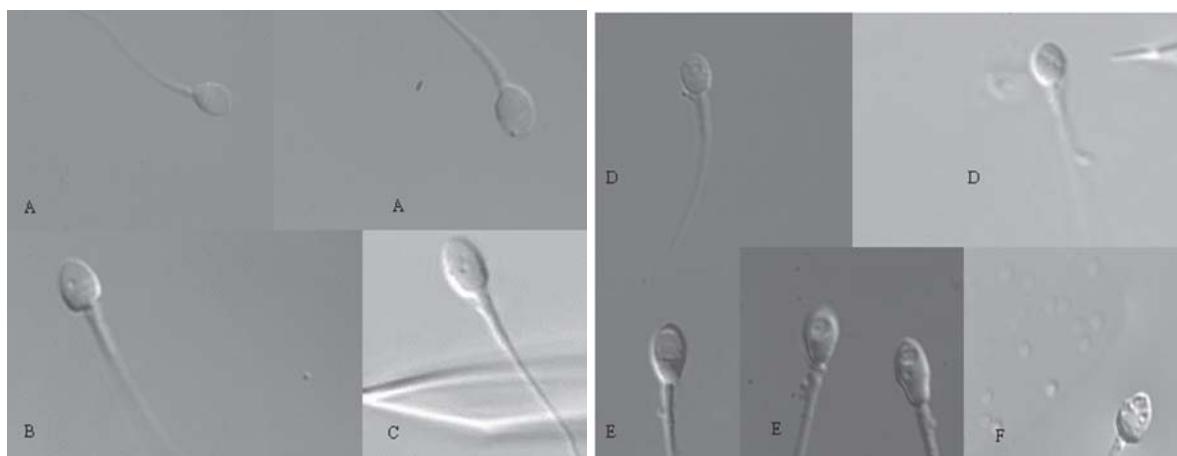
Poznana sta namreč dva tipa očetovih vplivov na razvoj zarodka- zgodnji očetov vpliv, ki škodi pooploditvenemu razvoju zarodka od zgodnjega do pronuklearnega stanja, in pozen očetov vpliv, ki onemogoča ugnezditev ali povzroča izgubo nosečnosti kljub nastanku morfološko normalnega zarodka pred ugnezditvijo. Pozni očetov vpliv je povezan s povišano fragmentacijo DNK (Tesarik in sod., 2004, 2005).

Obstoj vakuol v jedru spermijev ima negativen vpliv na razvoj zarodka do razvojne stopnje blastociste in se pojavi po izrazitvi embrionalnega genoma, ki se zgodi približno 72 ur po oploditvi. Ocenjevanje prisotnosti vakuol lahko bistveno nadgradi prognostično informacijo, dobljeno po postopku ICSI. Uporaba morfoloških kriterijev za selekcijo zarodkov na 2. ali 3. dan gojenja, predvsem v primerih prenosa enega zarodka, je omejujoče vrednosti. Podaljšano gojenje zarodkov do 5. dneva je zato boljša strategija, s katero se lahko iz skupine zarodkov korektno identificira in izbere zarodek z večjo verjetnostjo uspešne ugnezditve, predvsem v primerih prenosa enega zarodka.

Injekcija jajčnih celic s spermiji, ki se razlikujejo v številu in velikosti vakuol, se bistveno razlikuje v razvoju do razvojne stopnje blastociste in kakovosti blastocist na 5. dan gojenja. Stopnja tvorbe blastocist je povezana z oceno injiciranega spermija: vakuole imajo negativen vpliv na razvoj zarodka (Vanderzwalm en sod., 2008).

### **Klasifikacija spermijev glede na velikost in število vakuol v glavi** (Vanderzwalm en sod., 2008):

- razred I: spermij brez vakuol (slika 17a),
- razred II: spermij z maksimalno dvema majhnima vakuolama (<4% volumna glave spermija) (slika 17b in c),
- razred III: spermij z več kot dvema majhnima vakuolama (slika 17d) ali največ eno veliko vakuolo (slika 17e),
- razred IV: spermij z velikimi vakuolami v povezavi z nepravilnimi oblikami glave in drugimi morfološkimi nepravilnostmi (slika 17f).



Slika 17: Klasifikacija spermijev glede na velikost in število vakuol. Po injekciji spermijev razreda I (slika a) in II (slika b in c) se je 60,5% injiciranih jajčnih celic razvilo do razvojne stopnje blastociste in 37,2% do blastociste dobre kakovosti. Nasprotno je injekcija spermijev razreda III (slika d, e) in IV (slika f) dala samo 3,8% zarodkov razvitih do razvojne stopnje blastociste in le 1,3% do blastociste dobre kakovosti (Vanderzwalm en sod., 2008).

Med fragmentacijo DNK in stopnjo razvoja zarodka do razvojne stopnje blastociste po klasičnem IVF in ICSI postopku obstaja negativna povezava (Loutradi in sod., 2006). Pri spermijih z velikimi jedrnimi vakuolami je odstotek pozitivne fragmentacije DNK bistveno višji (29,1%) kot pri spermijih z normalnim jedrom (15,9%). Odstotek enoverižnih/denaturiranih DNK je prav tako bistveno višji pri spermijih z velikimi jedrnimi vakuolami (67,9%) kot pri spermijih z normalnim jedrom (33,1%). Fragmentacija DNK naj ne bi bila

povezana z apoptozo, ampak naj bi bila znak nepravilnega zorenja spermijev, najverjetnejše ima izvor v času pakiranja DNK. Več denaturirane DNK v spermijih z velikimi jedrnimi vakuolami je lahko posledica prezgodnje dekondenzacije in razdružitve kromatinskih vlaken spermijev (Franco in sod., 2008).

Fragmentacija DNK spermija je močno povezana s ponavljanjem neuspelimi poskusi ICSI. Fragmentacija DNK, določena z metodo TUNEL, je obravnavana kot normalna, ko je odstotek fragmentacije nižja kot 30%, kot zmerna, ko je 30 - 40% in kot visoka, ko je fragmentacija višja kot 40%. Povišana fragmentacija DNK je povezana z zmerno teratozoospermijo v 6,9%, s skrajno teratozoospermijo v 13,9%, z oligoastenozoospermijo in normalno morfologijo spermijev v 4,2% in z normalnimi osnovnimi parametri semena v 4,2%. Opazno povišanje verjetnosti ugnezditve zarodka in rojstva je vidno tako pri bolnikih z normalno, zmerno in visoko stopnjo fragmentacije DNK spermijev, če se namesto postopka ICSI uporabi postopek IMSI (Hazout in sod., 2006).

Povišan delež enoverižne DNK v spermijih neplodnih moških po pripravi (gostotnem gradientu) je povezan z nižjim številom zarodkov, ki so primerni za prenos in zamrzovanje (Virant - Klun in sod., 2002b).

Na živalskem modelu (glodavci) je bilo pokazano, da lahko pri postopku ICSI uporaba spermija, ki ima fragmentirano DNK, generira vplive, ki se pojavi pozneje v življenju, kot so odstopanja od rasti, prehitro staranje, nenormalno obnašanje in mezenhimski tumorji. Poročano je bilo tudi, da lahko spermij s poškodovano DNK oplodi jajčno celico, ki se razvije v visoko kakovosten zgodnji zarodek, vendar se potem, ko obseg poškodb DNK naraste, verjetnost uspešne nosečnosti zmanjša. Jajčna celica naj bi imela sposobnost popravila poškodb DNK spermija, kadar je le-ta poškodovana manj kot 8%. Glede na stopnjo fragmentacije DNK spermija se pričakujejo tri možnosti: v nekaterih primerih popravljalni mehanizem ni uspešen in se zato zarodek ne razvije ali ne ugnezdi v maternico ali pa pride do spontanega splava; v drugih primerih jajčna celica popravi prelome DNK verig še pred začetkom prve delitev in je zato spermij sposoben generirati normalne potomce; najslabša in zadnja možnost pa je ta, da zaradi delnega popravila poškodovane DNK spermija nastanejo delecije ali napake sekvenc, kar pa se lahko konča v nenormalnostih potomca (Fernandez-Gonzalez in sod., 2008).

Priprava spermijev bi morala biti izvedena pri 21° C, saj je podaljšano ravnanje s spermiji pri 37° C odločilno za morfologijo spermija. Vakuoliziranost spermijev je večja po inkubaciji na 37° C kot na 21° C. Ker se po 4 urah *in vitro* inkubiranja na 37° C fragmentacija DNK v spermijih poviša in ker med 24 urno inkubacijo na 37° C naraste nekondenziran kromatin iz 25% na 91% je verjetno, da prisotnost velikih jedrnih vakuol, kot tudi dekondenzacija kromatina in fragmentacija DNK, vključujejo enake encimske aktivnosti, ki so optimalne pri 37° C in so škodljive za kromatin spermija (Peer in sod., 2007).

Biokemični mehanizmi pojave velikih vakuol in njihov vpliv na pozni embrionalni razvoj nista jasna in sta lahko genetsko pogojena (Berkowitz in sod., 2006). Razumevanje vzroka poškodb DNK spermijev in celoten vpliv katerekoli morfološke nepravilnosti spermija na izid reprodukcije ostaja neodkrit (Franco in sod., 2008).

### 2.3.3 Otroci rojeni po postopku IMSI

Otroci, rojeni po postopku ICSI, kažejo statistično značilen višji riziko za večje prirojene razvojne nepravilnosti v primerjavi z otroki, rojenimi po postopku IMSI (7.9% proti 2.8%). Morfološka ocena jedra spermija je povezana s pojavnostjo večjih prirojenih razvojnih nepravilnosti pri otrocih, rojenih po mikroinjekciji. Zatorej injekcija spermija z normalnim jedrom zmanjša verjetnost večjih prirojenih razvojnih nepravilnosti pri ICSI otrocih. Možnost imeti zdravega otroka po postopku IMSI je večja v primerjavi z običajnim ICSI postopkom (Berkovitz in sod., 2007).

## 2.4 NOVEJŠE, NEINVAZIVNE TEHNIKE IZBORA SPERMIJEV PRI MOŠKIH S SLABO KAKOVOSTJO SEMENA

Poleg IMSI obstajajo tudi drugi načini selekcije spermijev:

Merilo za merjenje zrelosti, funkcije in oploditvene sposobnosti spermijev je v modu izražen šaperon HspA2. Pri normalnem zorenju spermijev se HspA2 izraža v sinaptonemalnem kompleksu spermatocite ter tako vzdržuje mejozo. HspA2 je povezan tudi s procesi pozne spermioogeneze, kot so izguba citoplazme, preoblikovanje plazmatske membrane in tvorba vezavnih mest za hialuronsko kislino (HA) v coni pelucidi. V nezrelih spermijih se HspA2 ne izraža, kar povzroča okvare med mejozo, prisotnost citoplazmatskega ostanka, peroksidacijo lipidov in posledično fragmentacijo DNK, nenormalno morfologijo spermijev in nesposobnost vezave cone pelucide na HA. Da se za postopek ICSI izbere zrele spermije, se petrijevke, v katere se da spermije za selekcijo, prevleče s HA. Na HA se vežejo samo zreli spermiji. HA-vezani spermiji imajo 4-6krat manj kromosomskih disomij in diploidij. Študije so pokazale, da morfologija spermijev ne pripomore k selekciji haploidnih spermijev. Bistvena negativna povezava je bila ugotovljena med odstotkom HA-vezanih spermijev in protaminskim primanjkljajem, fragmentacijo DNK in nenormalno morfologijo semena (Nasr-Esfahani in sod., 2008; Huszar in sod., 2007; Jakab in sod. 2005).

Za hitro izolacijo živih, gibljivih in morfološko normalnih spermijev, ki imajo visoko integriteto DNK, je bil razvit elektroforezni pristop. Zreli spermiji so zaradi negativno nabitega glikokaliksa, bogatega s sialično kislino, bolj elektronegativni. Tako ločeni spermiji imajo po metodi TUNEL manj poškodb DNK. Po tej izolaciji spermijev je že bila dosežena nosečnost v primeru dolgotrajne neplodnosti para zaradi obsežnih poškodb DNK spermijev (Ainsworth in sod., 2007).

Obstaja tudi selekcija spermijev na osnovi loma svetlobe. Lom svetlobe (angl. *birefringence*) je razstavitev enega žarka svetlobe v dva, ko le-ta prehaja skozi specifičen material v odvisnosti od polarizacije svetlobe. Pri tej metodi se ocenjuje organizacijo jedra, akrosoma in repa spermija s pomočjo polarizacijske mikroskopije, ki je možna zaradi anizotropnih lastnosti protoplazmatskih tekstur spermija, katere povzročajo lom svetlobe. V zrelih jedrih spermijev je lom svetlobe povezan z nukleoproteinskimi filamenti, ki so

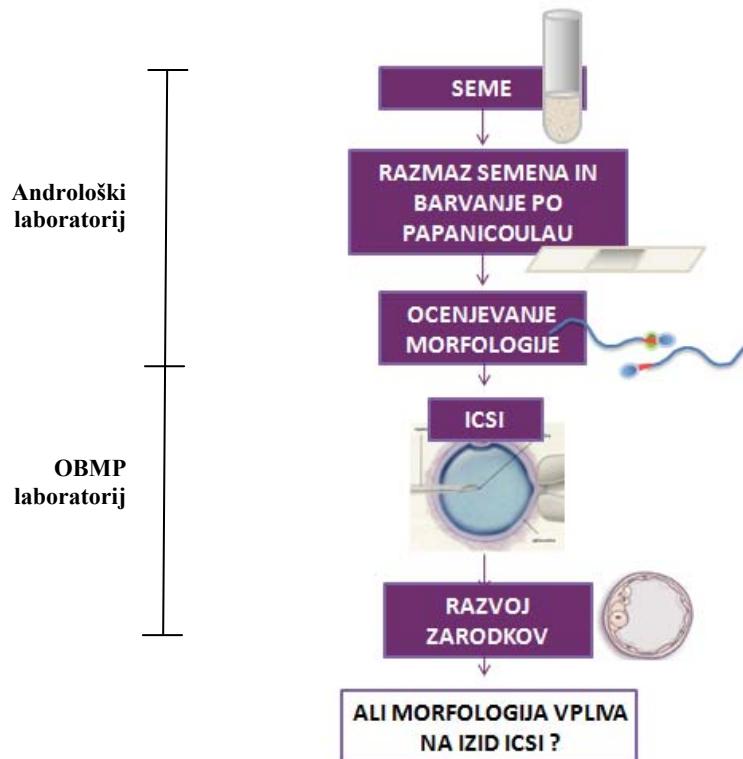
urejeni v verigah in orientirani vzdolžno. Prisotnost akrosomalnih proteinskih filamentov, ki so orientirani vzdolžno, povzroča lom svetlobe pri zrelem akrosomalnem kompleksu. Enako velja za strukturo srednjega dela in repa, v kateri so mikrotubuli organizirani v aksonemo. Lom svetlobe se ne pojavi v patoloških spermijih, kjer so protoplazmatske strukture poškodovane. ICSI se pri tej metodi izvaja pod polarizacijsko lučjo. Za injekcijo v jajčno celico se izbere spermij, pri katerem se svetloba lomi. Metoda ohranja spermije žive in gibljive (Gianaroli in sod., 2008).

Programirana celična smrt (apoptoza) prispeva k neuspelim postopkom OBMP in k manjši kakovosti semena po zamrzovanju. Nekateri spermiji, izbrani za OBMP, imajo značilnosti apoptoze kljub njihovemu normalnemu izgledu, kar ima lahko za posledico nizki stopnji oploditve in ugnezditve po postopku OBMP. Ena takih značilnosti apoptoze je sprostitev fosfatidilserinskih (PS) ostankov, ki so v normalnem stanju prisotni na notranji strani plazmatske membrane. Za selekcijo mrtvih in apoptotskih spermijev z ločevalnikom magnetno označenih celic MACS (angl. *magnetic-activated cell sorting*) se uporabijo koloidne supermagnetne mikrokroglice (premer ~50nm), povezane z molekulami *annexin V*, ki se vežejo z PS. Celice z zunanjimi PS se vežejo na te mikrokroglice. Neapoptotske celice z nepoškodovanimi membranami se ne vežejo in se uporabijo za postopek OBMP. Uporaba MACS kot del tehnik priprave semena izboljša kakovost spermijev in njihovo stopnjo preživetja po zamrzovanju (Said in sod., 2008).

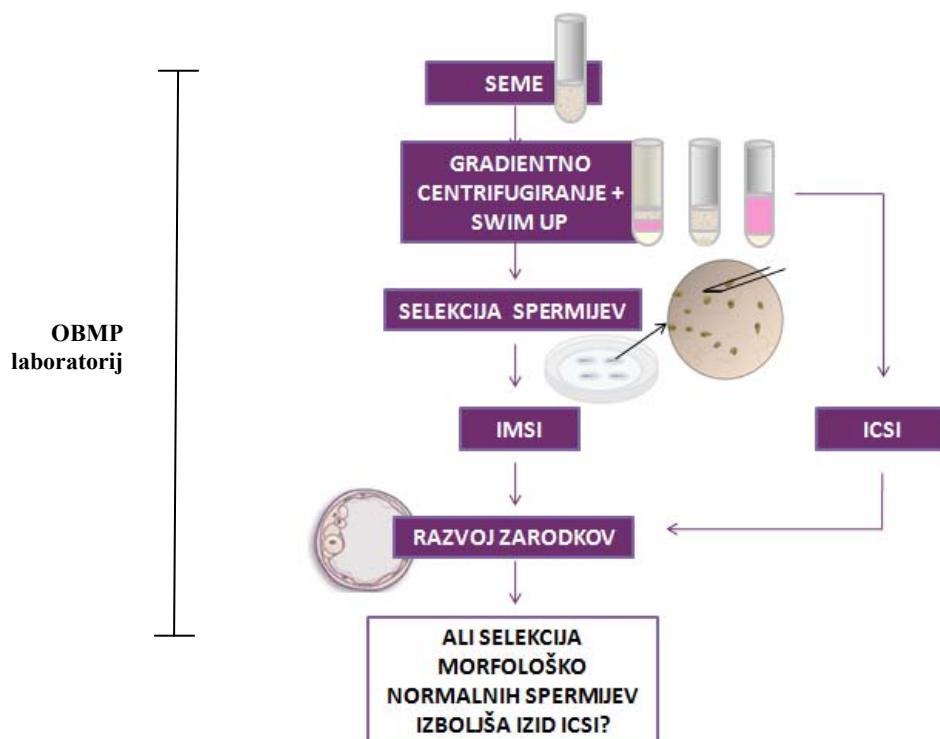
### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA

Shema poteka dela s hipotezami je vidna na slikah 18 in 19.



Slika 18: Shema poteka dela – hipoteza 1.



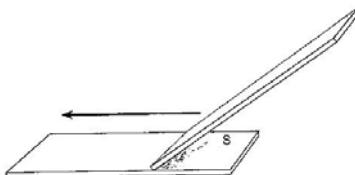
Slika 19: Shema poteka dela – hipoteza 2.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Ocena vpliva morfologije spermijev na izid postopka ICSI

#### 3.2.1.1 Priprava razmaza semena za ocenjevanje morfologije spermijev

Za razmaz smo uporabili semenski izliv (po 2 - 5 dnevni spolni abstinenci) bolnikov, vključenih v postopek zunajtelesne oploditve (postopek ICSI). Zaradi morebitnih težav z barvanjem je bilo potrebno za vsak svež semenski vzorec pripraviti dva preparata. Objektna stekla smo najprej očistili, jih sprali v 70% etanolu in jih osušili. Nato smo na sredino objektnega stekla kapnili majhno kapljico semena (5 - 20 µl). Če je bila koncentracija vzorca več kot  $20 \times 10^6$  spermijev/ ml, smo uporabili samo 5 µl semena. Če je bila koncentracija manj kot  $20 \times 10^6$  spermijev/ ml, smo uporabili 10 - 20 µl semena. Za razmaz semena smo uporabili drugo, čisto objektno steklo; rob objektnega stekla smo uporabili za razmaz semena po površini objektnega stekla, kot prikazuje slika 20:



Slika 20: Priprava razmazov semena (WHO..., 1999).

Potrebno je bilo paziti, da nismo naredili pretankega razmaza. Ta način razmaza smo uporabili, če seme ni bilo preveč viskozno. Za bolj viskozno seme pa smo na sredino objektnega stekelca kapnili kapljico semena, nanjo pa položili drugo objektno steklo, tako da se je seme razporedilo med njiju. Stekelca smo nato ločili in tako istočasno naredili dva razmaza.

Včasih je bilo dobre preparate težko pripraviti zaradi različne viskoznosti semenske plazme, zaradi česar so bili lahko razmazi neenakomerno debeli. Zato smo pri nizkih koncentracijah spermijev ali viskoznih vzorcih semensko plazmo razredčili in odstranili po centrifugiranju. Pelet spermijev smo resuspendirali v primernem volumnu, da smo dobili najvišjo koncentracijo spermijev, ki pa ni presegala  $80 \times 10^6$  spermijev/ ml. Od 0,2 - 0,5 ml semena, odvisno od koncentracije, smo dodali v 10 ml normalne fiziološke raztopine. Nato smo 10 min centrifugirali na 800 g. Večino supernatanta smo odpipetirali, pelet pa z nežnim pretresanjem epruvete resuspendirali v ostali fiziološki raztopini, ponavadi 20 - 40 µl. 5 - 10 µl suspenzije smo nato razmazali po objektnem steklu, kapljico pa razmazali s pomočjo pipete. Nato smo pod mikroskopom pogledali, če je koncentracija spermijev primerna: najmanj 40 spermijev na vidno polje pod 400-kratno povečavo, brez prekrivanja spermijev. Če je bil preparat pregost, smo uporabili manjši volumen semena ali pa smo vzorce razredčili in naredili nov razmaz. Če je bilo premalo spermijev na preparatu, smo uporabili več semena. Tako pripravljeni preparate smo nato pobarvali po Papanicolaou (prirejeno po WHO..., 1999).

#### 3.2.1.2 Barvanje razmaza semena po Papanicolaou

Še mokre preparate smo najmanj 30 minut fiksirali v koncentriranem (96%) etanolu. Preparate smo nato barvali po Papanicolaou: preparate smo najprej za 2 minuti potopili v barvilo 1a (hematoksilin). Nato smo jih sprali z vodo in 70% etanolom. Sledilo je eno

minutno barvanje z barvilm 2a (*orange G- OG 6*). Nato smo preparate dvakrat sprali s koncentriranim etanolom. Nato smo 3 minute barvali še z barvilm 3a (*EA 31*) ter na koncu dvakrat sprali s koncentriranim etanolom in dvakrat z absolutnim etanolom. Ko je bil preparat obarvan, smo ga pustili 30 minut stati v ksilolu in ga nato pokrili s kanada balzamom in krovnim stekelcem. Tako smo dobili trajni preparat, ki se ga lahko uporabi tudi za kasnejše preiskave (slika 7).

#### **Preglednica 8: Materiali za barvanje po Papanicolaou**

Barvilo	Originalno ime	Proizvajalec/ kataloška številka	Opis
1a	Harris hematoxylin solution	Merck 1.09253	Jedra obarva modro, temno vijolično do črno. Hematoksilini se povežejo s trivalentnimi pozitivno nabitimi kovinskimi ioni, ti pa se vežejo na DNK.
2a	Orange G solution	Merck 1.06888	Daje bledorumerno/ oranžno barvo citoplazme. Barvilo se veže na negativno nabite citoplazmatske proteine. Obarva keratin.
3a	Polychrome solution EA 31	Merck 1.09271	Obarva repe spermijev. Obarva citoplazmatske komponente. Je rjave barve.

#### **3.2.1.3 Ocena deleža morfološko normalnih spermijev**

Morfološko oceno spermijev smo naredili na invertnem svetlobnem mikroskopu Carl Zeiss Amplival pod 1000-kratno povečavo (objektiv 100-kratni). Objektna stekelca z razmazi semena smo na spodnji strani namazali z imerzijskim oljem. Na vsakem spermiju smo ocenili glavo, vrat, srednji del in rep. Da je bil spermij normalen, so morali biti vsi širje deli spermija normalni glede na merila SZO. Vsak spermij smo šteli samo enkrat, tudi če je imel več nepravilnosti - najprej smo ocenili normalnost glave; če je bila le-ta nepravilna, smo šteli nepravilnost samo kot nepravilnost glave, kljub temu če je imel spermij še ostale morfološke nepravilnosti. Ocenjevali smo v nekaj naključno izbranih področjih preparata, običajno v štirih. Ocenjevali smo vse spermije po vrsti, nobenega nismo izpustili, razen če sta se dva spermija prekrivala ali če je glava spermija ležala na robu preparata. Težili smo k temu, da smo na razmazu ocenili 100 spermijev; toliko, kot jih rutinsko ocenijo v androloškem laboratoriju. Če je bilo na razmazu premalo spermijev, smo jih ocenili 50. En razmaz smo ocenjevali največ 2 uri; po tem času smo prenehali z iskanjem spermijev, tudi če jih nismo ocenili vsaj 50. Nato smo zapisali število najdenih normalnih spermijev, število najdenih nenormalnih spermijev, število spermijev z nepravilno glavo, število spermijev z nepravilnim vratom, število spermijev z nepravilnim srednjim delom in število spermijev z nepravilnim repom.

#### **3.2.1.4 Statistično ugotavljanje povezave med morfologijo spermijev in izidom postopka ICSI**

Za statistično analizo smo za vsakega bolnika uporabili podatke dveh vrst, in sicer podatke o postopku in izidu ICSI (iz obrazca v Prilogi B) in podatke iz spermograma/morfograma, ki smo ga ocenili v androloškem laboratoriju.

Podatki o postopku in izidu ICSI:

- datum izvedbe postopka

- starost ženske
- število izsesanih (aspiriranih) jajčnih celic
- število degeneriranih jajčnih celic
- število nezrelih jajčnih celic (GV - germinalni vezikel, MI - mejoza I)
- število injiciranih jajčnih celic
- število oplojenih jajčnih celic
- število blastocist
- število morul
- število razvojno zaustavljenih zarodkov
- razvojna stopnja prenesenih zarodkov (za blastocisto se vpiše 3, za morulo 2, za razvojno zaustavljen zarodek 1)
- število prenesenih zarodkov
- število zavrženih zarodkov (ex)
- število zamrznjenih zarodkov
- nosečnost (1- je nosečnost; 0- ni nosečnosti)
- stopnja oploditve (se izračuna kot število vseh oplojenih jajčnih celic na število injiciranih jajčnih celic)
- stopnja razvoja blastocist (se izračuna kot število blastocist na število oplojenih jajčnih celic).

Podatki iz spermograma (morfograma):

- skupaj najdeno število spermijev na preparatu
- število morfološko normalnih spermijev
- število morfološko nenormalnih spermijev
- število spermijev z morfološko nepravilno glavo
- število spermijev z morfološko nepravilnim vratom
- število spermijev z morfološko nepravilnim srednjim delom
- število spermijev z morfološko nepravilnim repom.

Razmaz spermijev in postopek ICSI sta bila narejena na istem vzorcu semena in isti dan.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program *SPSS Illinois Inc.* S pomočjo logistične regresije smo iskali povezavo med morfologijo spermijev (delež normalnih spermijev) in izidom postopka ICSI (stopnja oploditve, razvoj zarodkov do razvojne stopnje morule, razvoj zarodkov do razvojne stopnje blastociste in nosečnost). Razlike so bile statistično značilne pri  $P < 0,05$ .

S Spearmanovim koeficientom korelacije smo preverili, ali katera od posameznih morfoloških nepravilnosti spermijev (nepravilne glave, nepravilni vratovi, nepravilni srednji deli, nepravilni repi) še posebej negativno vpliva na izid postopka ICSI (stopnjo oploditve, razvoj zarodkov do razvojne stopnje morule, razvoj zarodkov do razvojne stopnje blastociste, število razvojno zaustavljenih zarodkov, število prenesenih zarodkov, število zavrženih zarodkov, število zamrznjenih zarodkov in nosečnost). Razlike so bile statistično značilne pri  $P < 0,05$ .

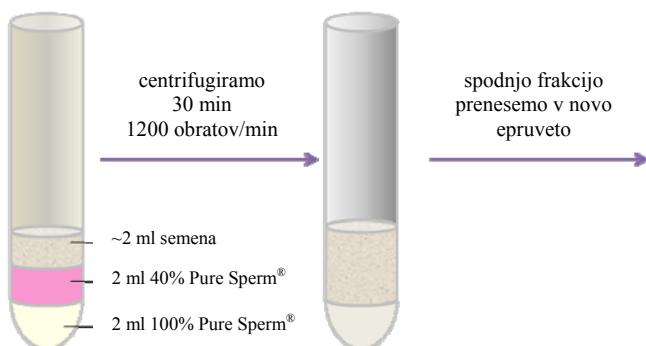
### 3.2.2 Ocena vpliva selekcije morfološko normalnih spermijev (IMSI) na izid postopka ICSI

#### 3.2.2.1 Priprava semena za postopka IMSI in ICSI

Seme, ki ga je bolnik oddal v posodici (Schol), smo pustili pol ure na sobni temperaturi, da je se utekočinilo. Ocenili smo volumen semena. Eno kapljico semena smo pogledali pod mikroskopom in ocenili koncentracijo in gibljivost spermijev. Pogledali smo tudi morfogram iz prejšnjega pregleda v androloškem laboratoriju in zapisali odstotek morfološko normalnih spermijev.

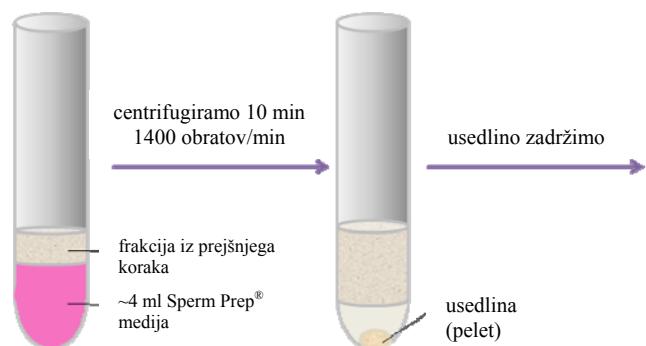
V veliko epruveto (14 ml) smo nanesli dve različni koncentraciji medija Pure Sperm®: spodaj 2 ml 100% raztopine, zgoraj pa 2 ml 40% raztopine. 40% Pure Sperm® smo dobili tako, da smo zmešali Sperm Prep® medij in medij Pure Sperm® v razmerju 4:6. Na to smo nanesli približno 2 ml semena. Vrhinja plast je morala biti manjša od spodnje, da se nista premešali.

Nato smo centrifugirali 30 minut na 1200 obratih na minuto. Temu delu čiščenja semena se pravi gradientno centrifugiranje (slika 21).



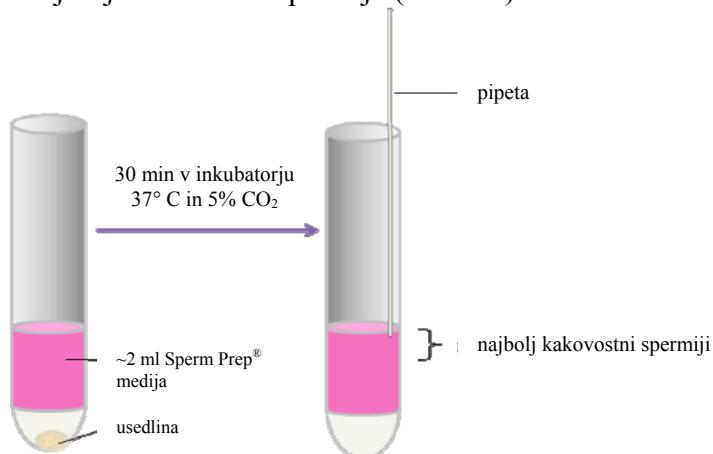
Slika 21: Potek gradientnega centrifugiranja.

Po centrifugiraju smo oddelili vrhnja dva sloja, zadržali pa samo spodnjo, 100% frakcijo, ker je vsebovala žive in gibljive spermije. Omenjeno frakcijo smo prenesli v centrifugirko na 4 ml medija za pripravo semena Sperm Prep®, dobro premešali in centrifugirali 10 minut pri 1400 obratih na minuto. Temu delu priprave semena se pravi spiranje in je pomemben predvsem zato, da se čim bolj znebimo Pure Sperm®-a (slika 22).



Slika 22: Potek spiranja.

Po centrifugirjanju smo odstranili supernatant, tako da nam je ostalo približno 1 ml usedline, čez usedlino pa smo previdno nalili svež Sperm Prep® medij ter jo inkubirali v CO<sub>2</sub> inkubatorju 30 min pri 37° C in 5% CO<sub>2</sub>. Količina Pure Sperma® je bila odvisna od količine usedline; če je je bilo več, smo ga nalili več, običajno od 0,3 ml do 0,7 ml. To je metoda 'splavanja na površje' (angl. *swim-up*). Najbolj vitalni spermiji so v tem času splavali na površino medija. Odvisno od tega, kako dobro je bilo seme, je lahko to trajalo od 5 min pa do pol ure. Suspenzijo spermijev, odvzeto s površine medija, smo nato uporabili za izvedbo postopka zunajtelesne oploditve. Seme je bilo po tej pripravi prečiščeno, spermiji pa bolj koncentrirani, manj lepljivi in bolje gibljivi. S takšno pripravo semena smo izbrali najbolj kakovostne spermije (slika 23).

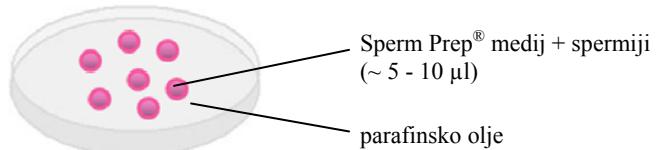


Slika 23: Potek metode splavanja na površje (angl. *swim up*).

Metoda splavanja na površje naj bi izločila spermije z nenormalno DNK. Poškodbe DNK padejo po metodi splavanja na površje iz 12% na 5,5%, fragmentacija DNA po gradientnem centrifugirjanju pa iz 28 % na 24 % (Moskovtsev, 2008).

### 3.2.2.2 Priprava posodic za postopek ICSI

Ko je bila metoda splavanja na površje gotova, smo s pipeto vzeli majhno kapljico iz zgornje plasti epruvete, jo dali v pokrovček male petrijevke in jo pod malo povečavo pogledali, da smo videli koncentracijo spermijev. Če je bila pregosta, je bilo potrebno kapljico redčiti s Sperm Prep® medijem. Redčili smo toliko časa, dokler nismo dobili primerne koncentracije. V pokrovček male petrijevke (TC dish, Nunc®) smo naredili približno sedem 5 - 10 µl kapljic spermijev ustrezne koncentracije. Kapljice smo nato prekrili s sterilnim parafinskim oljem, ogretim na 37° C, da se niso izsušile ter da so ohranile primeren pH (slika 24). Do postopka ICSI smo jih hranili v CO<sub>2</sub> inkubatorju na 37° C in v 5% CO<sub>2</sub>.



Slika 24: Posodica za postopek ICSI.

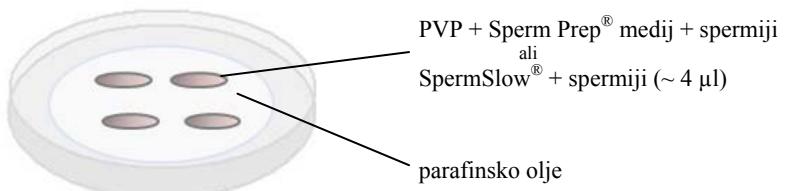
### 3.2.2.3 Priprava posodic za postopek IMSI

Po končani metodi splavanja na površje smo iz zgornje frakcije epruvete previdno vzeli majhno kapljico prečiščenih spermijev in jo pogledali pod mikroskopom, da smo videli koncentracijo spermijev. Če je bilo spermijev preveč, smo jih razredčili s Sperm Prep® medijem, dokler nismo dobili primerne koncentracije.

Na sterilni posodici WillCo®, ki ima stekleno dno, smo z avtomatsko pipeto naredili približno 4 zelo tanke 4 µl kapljice mešanice PVP medija (ali SpermSlow® medija) in Sperm Prep® medija v razmerju 1:1 (če smo uporabili medij SpermSlow®, ga nismo redčili). V vsako kapljico smo nato z avtomatsko pipeto, v kateri smo imeli spermije primerne koncentracije, dodali spermije, dokler nismo dobili končne koncentracije ~1000 spermijev na 1 µl. V vsaki pripravljeni kapljici smo imeli tako približno 4000 spermijev (slika 25). Kapljice smo prelili s parafinskim oljem, ogretim na 37° C.

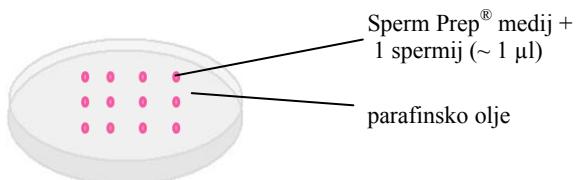
V primeru, če so bili spermiji zelo gosti, jih je bilo potrebno razredčiti z večjo količino Sperm Prep® medija, da smo dobili primerno koncentracijo. Zato smo v tem primeru za pripravo kapljic uporabili neredčen PVP medij, saj bi bili sicer spermiji preveč razredčeni in jih PVP medij ne bi zaustavil, kar bi nam zelo otežilo delo.

Zelo je bilo pomembno, da spermiji v kapljici niso bili pregosti, ker se je potem mikroinjekcijska pipeta velikokrat zamašila in jo je bilo potrebno menjati.



Slika 25: Posodica za postopek IMSI.

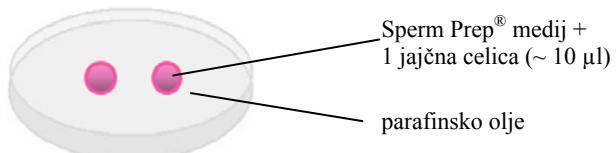
Pripravili smo tudi posebno posodico, ki je vsebovala kapljice Sperm Prep® medija, kamor smo prenesli selekcionirane spermije, ki smo jih v naslednjem koraku uporabili za injekcijo. V ta namen smo v pokrovčku male petrijevke (TC dish, Nunc®) z avtomatsko pipeto naredili 1 µl kapljice Sperm Prep® medija (slika 26). Ponavadi smo pripravili dvakrat več kapljic kot smo imeli jajčnih celic za injekcijo; za vsak primer smo za vsako jajčno celico našli dva spermija; če kakšnega spermija ne bi mogli najti v kapljici oz. če bi ga poškodovali ali izgubili med samo injekcijo. Mikrokapljice smo prelili s parafinskim oljem, ogretim na 37° C ter jih pred uporabo inkubirali v CO<sub>2</sub> inkubatorju na 37° C in 5% CO<sub>2</sub>. Spermiji so si med plavanjem po Sperm Prep® mediju sprali PVP ozziroma SpermSlow® iz svoje površine.



Slika 26: Posodica za selekcionirane spermije.

### 3.2.2.4 Priprava posodic za jajčne celice

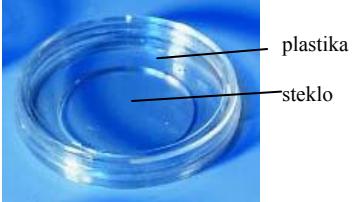
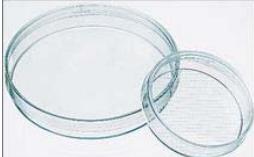
V sterilnem pokrovčku male petrijevke (TC dish, Nunc<sup>®</sup>) smo pripravili po dve 10 µl kapljici Sperm Prep<sup>®</sup> medija in jih prekrili s parafinskim oljem, ogretim na 37° C, ter inkubirali v CO<sub>2</sub> inkubatorju na 37° C in 5% CO<sub>2</sub>. Pred injekcijo smo vanje dali jajčne celice, ki smo jim tik pred tem z encimom hialuronidazo odstranili kumulus. V vsako kapljico smo dali po eno jajčno celico (slika 27).



Slika 27: Posodica za jajčne celice.

### Preglednica 9: Materiali za postopka IMSI in ICSI

Medij	Proizvajalec in kataloška številka	Opis	Sestava
Pure Sperm <sup>®</sup>	NidaCon PS100-100	Pure Sperm <sup>®</sup> je sterilna suspenzija koloidnih silikonskih delcev v izotonični raztopini soli. Optimizirana je za pripravo gostotnega gradiента za ločevanje in čiščenje humanega semena za uporabo za OBMP. Sistem učinkovito loči normalne spermije od limfocitov, epitelnih celic, nenormalnih ali nezrelih spermijev, celičnega debrija, bakterij in semenske tekočine.	Silikonski delci, obdani s silanom, kalcijevi ioni, kloridni ioni, kalijevi ioni, natrijevi ioni, voda, HEPES, EDTA, glukoza.
Sperm Prep <sup>®</sup> medij	MediCult 10701010	Sperm Prep <sup>®</sup> medij se uporablja za spiranje in za ločevanje z metodo splavanja na površje; uporablja se tudi kot vzdrževalni medij za jajčne celice pred ICSI postopkom; uporablja se za kapacitacijo spermijev (odstranitev semenske plazme). Pri tehnikah priprave spermijev je zelo pomembna selekcija vitalnih in gibeljivih spermijev. Medij je podoben mediju, ki se uporablja za oploditev ali gojenje zarodkov.	sintetično nadomestilo seruma SSR ( <i>Synthetic Serum Replacement</i> ), fiziološke soli, glukoza, HSA, natrijev piruvat, natrijev bikarbonat, HEPES, penicilin, streptomycin, fenol rdeče.
PVP	MediCult 10890001	PVP medij se zaradi svoje viskoznosti uporablja za upočasnitev gibanja spermijev pri postopku ICSI in IMSI. Glavna komponenta je polivinilpirolidon.	sintetično nadomestilo seruma SSR ( <i>Synthetic Serum Replacement</i> ), fiziološke soli, glukoza, HSA, natrijev piruvat, natrijev bikarbonat, polivinilpirolidon (PVP) ( <i>polyvinylpyrrolidone</i> ), HEPES, penicilin, streptomycin, fenol rdeče.

SpermSlow®	MediCult 1094	Uporabi se za selekcijo zrelih spermijev pred postopkom ICSI. Ni splošen medij za upočasnitev kot PVP. Glavna komponenta je hialuronska kislina (HA), ki je naravno prisotna v človeškem telesu. HA tvori mrežo, kamor se vežejo zreli spermiji in so s tem začasno upočasnjeni; nezreli spermiji se prosti gibljejo.	Hialuronska kislina (HA), humani albumin (HAS), rekombinantni humani inzulin, penicilin, streptomycin.
Parafinsko olje	MediCult 10105060	Tekoči parafin se uporablja kot oljna obloga za gojitveni medij med postopkom IVF in ICSI. Pomaga stabilizirati pH in zniža izhlapevanje vode iz mikrokapljic med postopkom.	Lahko mineralno olje.
Posodice s steklenim dnom WillCo®	WillCo GWSt-1000	Sterilne posodice s steklenim dnom, debeline 0,17 mm in premera 39 mm se uporabljajo za opazovanje pod visoko povečavo (6000-kratno, DIC optika).	
Plastične posodice	Nunc 153066	Sterilne posodice iz polistirena, premera 35 mm, primerne za gojenje celičnih kultur in za mikroskopijo. Uporabi se pokrovčke.	
Mikroinjekcijska pipeta	COOK K-MPIP-3135	Pipeta je oblikovana za natančen nadzor nad spermiji in za preluknjanje cone pelucide. Notranji premer je 4,7 µm, zunanjji 6 µm. zaključni kot pipete je 35 stopinj.	

### 3.2.2.5 IMSI postopek

#### Mikroskop

Uporabili smo invertni svetlobni mikroskop Nicon ECLIPSE TE2000-S, ki je opremljen s posebno Nomarski DIC optiko, katera omogoča vidljivost vakuol v glavah spermijev. Mikroskop je imel poseben 100-kratni imerzijski objektiv (numerična aparatura=1,5) ter posebno kamero Nikon, ki je omogočala še dodatno povečavo. Kot del opreme so bili še računalnik in poseben program *NIS-Elements F*, ki je v času kazal povečano sliko vidnega polja. Tak sistem je omogočil 6000-kratno povečavo. Mikroskop je imel hidravlični mikromanipulacijski sistem *Eppendorf TransferMan NK2*, ki je omogočil prestavljanje pipet tudi do 40 nm natančno v katerokoli smer (x/y/z) z eno samo krmilno palico, ter si je lahko zapomnil 3 pozicije pipet. Mikroskop je imel tudi grelo mizico (37° C) (slika 28).

Uporabljali smo mikroinjekcijske pipete COOK. Pri seleksijskem koraku nismo potrebovali nosilne pipete.



Slika 28: Mikroskop za postopek IMSI v Laboratoriju za OBMP, Ginekološka klinika, UKC Ljubljana.

Povečava mikroskopa je povezana s štirimi lastnostmi slike:

- Optične ločljivosti, ki je odvisna od optike mikroskopa in izvora svetlobe na mikroskopu: teoretična resolucija je svetlobna dolžina deljeno z numerično aparatujo objektiva (v našem primeru ~1,5). Ta resolucija je ~200 nm za modro svetlobo in 300 - 350 nm za rdečo svetlobo. Pri uporabljeni belo-rumeni svetlobi je resolucija ~300 nm.
- Kontrasta slike, ki je povečan z Nomarski optiko (posebno fazno kontrastno procesiranje svetlobe).
- Maksimalne optične povečave; ~150, ki pa je definirana z naslednjimi faktorji:
  - povečava objektiva (100-krat)
  - povečevalni selektor (1,5-krat)
  - video povečava 0,99
- Povečave video sistema, ki se jo izračuna iz:
  - CCD čipa; dimenzija diagonale 8mm - a
  - TV monitorja; dimenzija diagonale 320mm - b

Zato je izračunana video povečava (b/a) ~40 (320/8). Odvisna je od velikosti zaslona.

V našem primeru je bila izračunana celotna povečava  $\sim 150 \times 40 = 6000$ -kratna. Dobljena številka je razmerje med velikostjo objekta na zaslonu in resnično velikostjo (prirejeno po Berkowitz in sod., 2005).

### Potek mikroskopiranja

Poteka mikroskopiranja in uporabe hidravličnega mikromanipulacijskega sistema (MS) smo se naučili v Parizu, v laboratoriju IVF v bolnišnici *Bleuets Hospital*.

1. Preden smo pričeli z delom je bilo potrebno do konca izprazniti hidravlične cevke in jih ponovno napolniti s parafinskim oljem. S tem smo se znebili vseh mehurčkov v cevki, ki so sicer motili delovanje (vsesavanje/izpust spermija v /iz mikroinjekcijske pipete).
2. Pod majhno povečavo smo izostrili dno plastične posodice in jo odmaknili. Sliko smo do nadaljnega pustili na miru (nismo vrteli mikro/makrometrskih vijakov). Na MS smo vključili gumbek COARSE, kar pomeni, da so se pipete premikale hitro. V desni nosilec smo vpeli mikroinjekcijsko pipeto. S krmilno palico smo jo nastavili tako, da smo jo jasno videli v vidnem polju. Obrnili smo jo v pravilen položaj. Nato smo jo malenkost dvignili, da smo dobili megleno sliko pipete. To lego pipete smo shranili kot pozicijo 1, tako da smo dolgo držali gumbek Pos1 na MS, dokler nismo zaslišali dveh kratkih piskov. Nato smo dvignili pipeto na najvišjo možno pozicijo - to pozicijo smo shranili kot pozicijo 3 (gumbek Pos3 na MS).
3. Nato smo preklopili na FINE gibanje (gumbek FINE) na MS, ki omogoča zelo natančno premikanje pipete.
4. Nad objektiv smo postavili steklene posodico s spermiji, ki smo jo pred tem po dnu namazali z imerzijskim oljem. Izostrili smo sliko pod majhno povečavo. Pritisnili smo pozicijo 1 na MS; s tem se nam je pipeta spustila nad dno posodice, vendar smo jo zelo medlo videli. Steklena posodica je bila namreč veliko bolj tanka od plastične, zato smo morali pipeto spuščati, dokler nismo dobili njene ostre slike; nato smo pipeto ponovno malo dvignili in shranili pozicijo kot pozicijo 2 (gumbek Pos2 na MS).
5. Preden smo pričeli s selekcijo spermijev, smo morali napolniti pipeto z medijem Sperm Prep®. Pipeto smo premaknili v kapljico, ki ni vsebovala spermijev (lahko v čisto 1 µl kapljico, pripravljeno za selekcionirane spermije). Iz mikropipete smo izpraznili zrak (nastali so črni mehurčki) in jo napolnili z medijem Sperm Prep®.
6. Kadar smo delali s plastično posodico, smo delali s pozicijo 1, ko pa smo uporabili steklene posodico, pa s pozicijo 2. Vmes smo dvigovali pipeto s pritiskom na pozicijo 3.

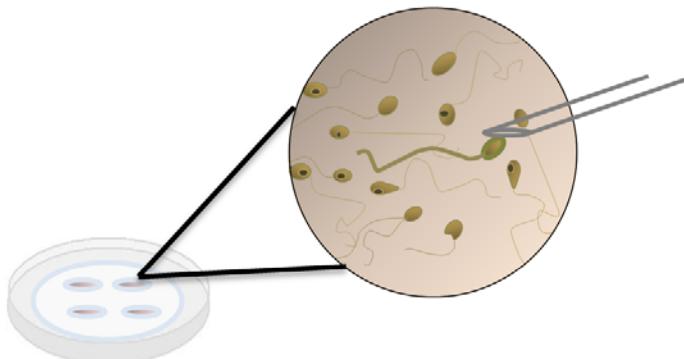
### Selekcija spermijev

Ko smo v stekleni posodici poiskali sliko pod 100-kratnim imerzijskim objektivom, smo spustili DIC osvetlitev. Spustili smo mikropipeto na pozicijo 2. Mikropipeto smo imeli med iskanem spermija in premikanjem po posodici vedno malo dvignjeno, da nam ni zakrivala vidnega polja in da se nam ni mašila s spermiji.

Da smo grobo ocenili morfološko stanje jedra spermija, je bilo potrebno slediti gibljivemu spermiju s premikanjem mikroskopske mizice v smereh x,y in z približno 20 sek. Zato je bil potreben PVP medij, da smo upočasnili hitrost gibanja spermija in da smo preprečili, da hitro gibljivi spermiji niso izginili iz zaslona, na katerem smo jih opazovali.

Če smo za upočasnitev uporabili medij SpermSlow®, smo izbrali morfološko normalen spermij, ki je bil vezan; miroval je z glavo, vendar migal z repom. Pri SpermSlow® nismo izbirali spermijev, ki so prosto plavali, kljub temu da so imeli normalno morfologijo.

Ko smo našli spermij z dobro oz. primerno morfologijo, smo ga vsesali v pipeto (slika 29). Spermij je bilo potrebno vsesati z repom naprej, zato da nam ni splaval po pipeti navzgor do meje medij/ zrak, saj ga je bilo v tem primeru zelo težko dobiti iz pipete. Nato smo si ga v mikropipeti podrobno pogledali; gibljiv spermij se je v mikropipeti obrnil okoli svoje osi, zato smo si lahko natančno ogledali njegovo morfologijo (slika31).



Slika 29: Izbor morfološko normalnega spermija pod 6000-kratno povečavo.

Za ocenjevanje morfologije smo uporabili prej opisano Cassuto-Barak klasifikacijo, ki smo se je naučili uporabljati v Parizu.

Pri vsakem spermiju smo ocenili obliko glave, prisotnost vakuol in obliko baze:

- glava: ocenili smo normalno obliko in velikost glave v obeh ravninah glede na merila SZO. Normalna oblika glave je bila definirana kot ovalna oblika s pravilnim robom; dolžina glave 3 do 5 µm, širina 2 do 3 µm. Ocenili smo z 1 za normalnost v dveh ali eni ravnini in 0 kot nenormalnost v obeh ravninah.
- vakuole: ocenili smo prisotnost ali odsotnost in kakovost vakuol. Odsotnost vakuol v glavi ali eno samo vakuolo z majhnim premerom smo ocenili z 1; ostalo pa z 0.
- baza glave: normalno obliko baze (črka U) smo ocenili z 1, nenormalno ( V, L, J ) z 0.

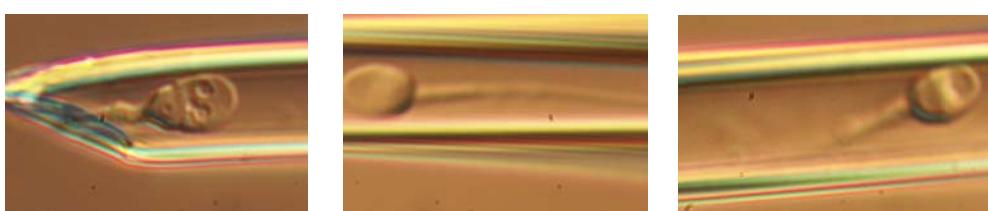
$$\text{Ocenitev morfologije spermija} = (2 \times \text{ocena glave}) + (3 \times \text{ocena vakuol}) + (\text{ocena baze})$$

Z drugimi besedami, normalna glava je prinesla 2 točki, normalna baza 1 točko ter odsotnost vakuol oz. ena mala vakuola 3 točke.

Vrednosti ocenjevanja po tej formuli so od 0 do 6. Spermije smo lahko na ta način razdelili v tri razrede:

- razred I - visoko kakovostni spermiji z oceno od 4 do 6
- razred II - spermiji srednje kakovosti z oceno od 1 do 3
- razred III - slaba kakovost spermijev z oceno 0.

Če je bil spermij zadovoljive kakovosti (razred I ali II), smo ga prenesli v kapljico v plastično posodico za selekcionirane spermije - vsakega v svojo. Embriolog ga je nato pod drugim mikroskopom imobiliziral, vsesal v injekcijsko pipeto in injiciral v jajčno celico.



Slika 30: Spermij v mikroinjekcijski pipeti pod 6000x povečavo.

### Potek dela

Približno polovico jajčnih celic ene ženske (angl. *sibling oocyte*) smo injicirali po metodi ICSI brez predhodne selekcije spermijev pod 6000-kratno povečavo, polovico pa po metodi IMSI, s čimer smo zmanjšali vpliv ženske oz. jajčne celice na izid postopka. S selekcioniranimi spermiji smo injicirali toliko jajčnih celic, kot smo našli primernih spermijev in kolikor so se dali spermiji lepo injicirati, a nikoli več kot polovico jajčnih celic. Kasneje smo injicirali tudi vse jajčne celice v ciklusu po postopku IMSI.

Pri postopku ICSI je embriolog v okviru zmožnosti ločevanja pod svetlobnim mikroskopom pod 400-kratno povečavo izbral morfološko normalen spermij; izločil je spermije z nepravilnimi oblikami glave, srednjih delov in repov.

Pri IMSI postopku smo injicirali spermije, ki smo jih izbrali pod 6000-kratno povečavo, kjer je poleg klasičnih nepravilnosti, vidnih pod 400-kratno povečavo, možno oceniti tudi jedrno vsebino, predvsem jedrne vakuole. Spermije smo ocenjevali po Cassuto-Barak klasifikaciji. Če nismo našli spermija razreda I, smo vzeli razred II. Če so bili na razpolago samo spermiji razreda III, smo naredili z jajčnimi celicami klasični postopek ICSI, saj se z razredom III ne doseže razvoja do povsem razvite blastociste (Cassuto in sod., 2008). Seleкционirane spermije razreda I in II smo prenesli v 1 µl kapljice (vsakega v svojo), embriolog pa jih je imobiliziral in injiciral v jajčno celico.

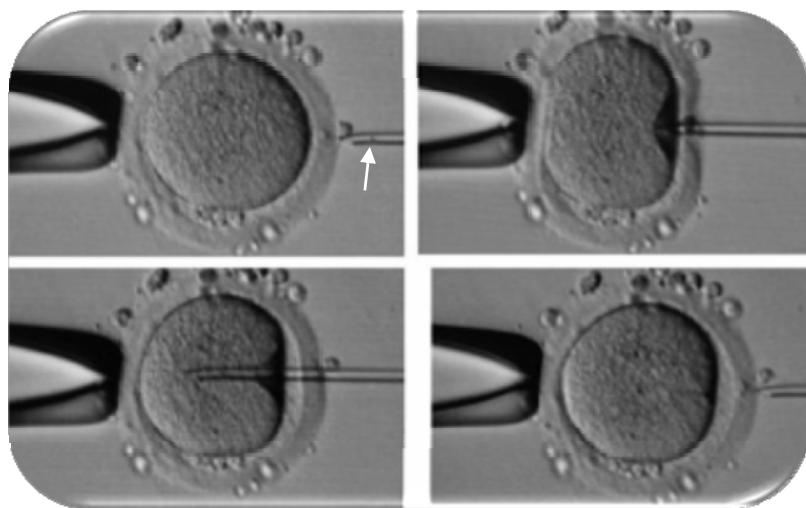
Jajčne celice, ki so bile injicirane po postopku IMSI in ICSI, so bile gojene ločeno. Vsak dan smo spremljali razvoj zarodkov in njihovo kakovost (obrazec v prilogi B).

#### 3.2.2.6 ICSI postopek

Za postopek ICSI smo uporabili invertni svetlobni mikroskop NICON DIAPHOT, ki je opremljen z mikromanipulacijskim sistemom (MS) Narishige.

Potek postopka ICSI:

1. Na levo stran MS smo namestili nosilno (angl. *holding*) pipeto in na desno stran MS mikroinjekcijsko pipeto. Iz mikroinjekcijske pipete smo spustili zrak in jo napolnili z medijem Sperm Prep®, zato da kasneje spermiji niso prišli v stik z zrakom ali parafinskim oljem.
2. Ko je bila grelna mizica ogreta, smo postavili posodico s spermiji na grelno ploščo. Mikroinjekcijsko pipeto smo potopili v kapljico.
3. Pri 400-kratni povečavi smo izbran spermij udarili po repu, da je obmiroval, kar se imenuje imobilizacija. S tem smo naredili poškodbo na plazmatski membrani, skozi katero so hitreje prodrli encimi iz jajčne celice. Spermij smo vsesali v pipeto.
4. Mikroinjekcijsko pipeto smo dvignili in zamenjali posodico s spermiji s posodico, v kateri smo imeli jajčne celice. Spustili smo obe pipeti.
5. Z nosilno pipeto smo prisesali jajčno celico, tako da je bilo polarno telesce na poziciji 12 ali 6.
6. Mikroinjekcijsko pipeto smo zabodli v celico na poziciji 3, malo citoplazme smo potegnili v pipeto in nato spustili spermij in citoplazmo v celico. Injekcijo smo naredili pod 200-kratni povečavo (slika 31).
7. Previdno smo umaknili mikroinjekcijsko pipeto iz celice in jo dvignili iz kapljice. Jajčno celico smo spustili iz nosilne pipete; obe pipeti smo dvignili iz kapljice.
8. Jajčne celice smo prestavili v petrijevko z dvojnim robom (z IVF gojiščem).



Slika 31: Potek postopka ICSI. Spermij je označen s puščico (Postopek ICSI, 2007).

### 3.2.2.7 Razvoj zarodkov

Na 1. dan smo ugotovljali oploditev jajčnih celic. V oplojeni jajčni celici sta bila opazna dva pronukleusa; eden je predstavljal dedno maso spermija, drugi pa jajčne celice. Govorili smo o oplojeni jajčni celici ali zigoti (slika 32). Po oploditvi se je zaključila mejoza jajčne celice in na površini jajčne celice se je sprostila druga majhna celice - polarno telesce. Oplojeno jajčno celico smo torej prepoznali po 2 pronukleusih in 2 polarnih telescih. Večinoma sta bila pronukleusa eden ob drugem, lahko pa sta ležala ločeno. Bila sta približno enako velika, lahko pa je bil en pronukleus precej večji kot drugi, kar je kazalo na večjo verjetnost genetskih nepravilnosti, na slabši razvoj zarodka in na slabšo možnost ugnezditve. Ležala sta lahko centralno, lahko pa tudi na strani, kar je kazalo na slabšo kakovost. Nukleolusi, mesta tvorbe zgodnje ribosomalne RNK, so bili številčno približno enaki v obeh pronukleusih. Večji nukleolusi so pomenili boljšo kakovost oplojene jajčne celice in boljši razvoj zarodka kot manjši in razpršeni. Pravilno oplojene celice smo prenesli v novo luknjico posodice (Multidish) in jim zamenjali medij.



Slika 32: Oplojena jajčna celica normalne kakovosti; pronukleusa ležita centralno, sta enako velika, s približno enakim številom nukleolusov, ki so nameščeni vzporedno (Virant-Klun,2004)

Na 2. dan je imel zarodek povprečno 2 do 4 celice. Nekateri zarodki so nekoliko pohiteli in so imeli lahko 5 ali 6 celic. Zarodek je bil dobre kakovosti, če je imel čim več celic, ki so bile enako velike in lepo okrogle. Meje med celicami so morale biti dobro vidne. Zarodek je moral imeti manj kot 10 volumskih odstotkov majhnih razdrobljenih delcev. Opazovali smo tudi večjedrnost (če se v celicah zarodka opazi namesto enega jedra več jeder), kar je bilo povezano z genetskimi nepravilnostmi. Zarodek je bil večjedrn že, če smo opazili eno samo celico z več jedri. Najpomembnejši kazalec kakovosti zarodkov pa je bila fragmentacija, ki naj bi predstavljala način za odstranjevanje nenormalnih celic. Zarodke smo prenesli v nov medij v novo luknjico posodice (Multidish).

Na 3. dan gojenja je imel zarodek, ki se je normalno razvijal, povprečno 6 do 10 celic. Za oceno kakovosti smo uporabili enake kriterije kot za oceno kakovosti na drugi dan gojenja- število celic, morfologijo (predvsem fragmentacija) in večjedrnost. Posodice z zarodki smo pustili na miru v CO<sub>2</sub> inkubatorju.

Na 4. dan gojenja je imel zarodek dobre kakovosti približno 32 celic in je dosegel razvojno stopnjo morule. Celice zarodka so postale ob medsebojnih mejah bolj ploščate, zelo tesno povezane in pričele so z medsebojno komunikacijo. Ob koncu razvoja morule so se pričele celice diferencirati in razvoj se je usmeril v nastajanje blastociste. Včasih je bilo težko ločiti pozno morulo in zgodnjo blastocisto. Zarodke smo prenesli v svež medij v novo luknjico.

5. dan gojenja smo lahko opazili blastocisto, ki je imela od 50 do 100/120 celic. Celice so bile že diferencirane v t.i. embrioblast in trofoblast. Velik del blastociste je zavzemal blastocel, votlinica napolnjena z vodo in metaboliti. Blastocista je imela lahko na začetku razvoja (zgodnja blastocista) majhen blastocel, delno razvita blastocista večji blastocel in povsem razvita (ekspandirana) blastocista povečan volumen in stanjšano cono pelucido (blastocel je napolnjeval skoraj vso blastocisto). Pomembno je bilo poznati kakovost blastociste, ki je vključevala naslednje parametre:

- stopnjo razvoja (ekspandiranosti)
- izluščenje (angl. *hatching*)
- razvitost embrioblasta (zelo pomembna, saj je to zametek nadaljnega razvoja zarodka po ugnezditvi)
- razvitost trofoblasta, ki se po ugnezditvi razvije v posteljico (prirejeno po Virant - Klun, 2004).

#### *Ocenjevanje kakovosti blastociste*

Glede na razvoj poznamo 6 kategorij (Gardner in sod., 2000):

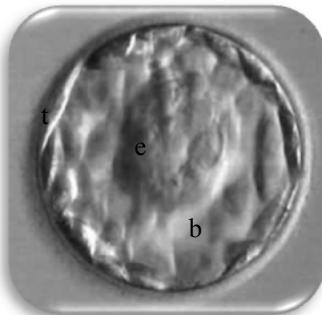
- Kategorija 1: zgodnja blastocista, pri kateri je blastocel zavzemal manj kot polovico volumna zarodka.
- Kategorija 2: razvita blastocista, pri kateri je blastocel zavzemal pol ali več volumna zarodka, volumen je ostal enak.
- Kategorija 3: razvita blastocista, pri kateri je blastocel zavzemal celoten volumen zarodka, vendar je ostajal volumen enak.
- Kategorija 4: ekspandirana blastocista, pri kateri je bil volumen blastocela večji od prvotnega blastocela, cona pelucida (ZP) je bila močno stanjšana; izgledalo je, kot da je blastocista napihnjena.
- Kategorija 5: blastocista, ki se je luščila, vsebina zarodka se je bočila ven iz ZP.
- Kategorija 6: izluščena blastocista; vsebina blastociste je že vsa zlezla ven iz ZP.

#### Kakovost embrioblasta

- A: (najboljše) embrioblast je bil dobro izražen, kompakten, iz veliko tesno skupaj zlitih celic
- B: embrioblast je bil slabo izražen, iz majhnega števila celic, ki niso tvorile kompaktne skupine
- C: embrioblast je bil iz zelo malo celic

### Kakovost trofoblasta

- A: (najboljše) trofoblast ji bil iz veliko celic, ki so se zlivale in tvorile nepretrgan 'epitelij'
- B: trofoblast je bil iz malo celic, ki so tvorile slabo izražen in pretrgan 'epitelij'
- C: trofoblast je bil iz zelo malo (ene, dveh, treh) velikih celic.



Slika 33: Blastocista 4AA; blastocista na 5. dan gojena; prenos se je končal z zdravo nosečnostjo in porodom (t - trofoblast, e - embrioblast, b - blastocel) (Blastocista 4AA, 2009).

Blastocista je bila zadnja razvojna stopnja zarodka, ki je še lahko živila *in vitro*. Kasneje je bil razvoj že preveč kompleksen in gojišča za razvoj *in vitro* niso več zadoščala. Med 50 do 60% vseh zarodkov v postopku zunajtelesne oploditve se razvije do razvojne stopnje blastociste. Na peti dan se je tako s posebnim katetrom preneslo največ dve blastocisti v maternico, nadštevilne zarodke pa se je zamrznilo (prirejeno po Virant - Klun, 2004).

#### 3.2.2.8 Primerjava izidov postopkov IMSI in ICSI

Primerjali smo izide postopkov IMSI in ICSI ter poskušali ugotoviti morebitno izboljšanje izidov po postopku IMSI. Beležili smo razvoj zarodkov (Obrazec v prilogi B), dobljenih po postopkih IMSI in ICSI. Posebej za postopek IMSI in za postopek ICSI smo izračunali naslednje izide:

- stopnjo oploditve: število oplojenih jajčnih celic (2PN) na število injiciranih jajčnih celic
- stopnjo razvoja morul: število morul (na peti dan gojenja) na število oplojenih jajčnih celic
- stopnjo razvoja blastocist: število blastocist (na peti dan gojenja) na število oplojenih jajčnih celic
- stopnjo razvoja morul in blastocist: število morul in blastocist (na peti dan gojenja) na število oplojenih jajčnih celic
- stopnjo razvoja zarodkov, ki so se razvojno zaustavili: število razvojno zaustavljenih zarodkov na število oplojenih jajčnih celic

Primerjali smo izide po postopkih IMSI in ICSI. Statistično značilne povezave smo izračunali s testom hi-kvadrat. Razlike so bile statistično značilne pri  $P < 0,05$ .

#### 3.2.2.9 Atlas morfologije spermijev, določene s sistemom IMSI

Med iskanjem normalnih spermijev za injiciranje v jajčno celico smo s pomočjo računalniškega programa *NIS-Elements F* pod 6000-kratno povečavo slikali spermije z različnimi morfološkimi nepravilnostmi, od najbolj deformiranih do normalnih. Naredili smo atlas morfologije spermijev, kjer smo predstavili spermije vseh treh razredov po Cassuto-Barak klasifikaciji; poleg tega smo predstavili tudi specifične morfološke nepravilnosti spermijev in močno deformirane spermije.

## 4 REZULTATI

### 4.1 OCENA VPLIVA MORFOLOGIJE SPERMIJEV NA IZID POSTOPKA ICSI

Po pripravi preparatov smo pod mikroskopom ocenili morfologijo spermijev po merilih SZO. Skupaj smo pregledali 52 preparatov. Vedno smo težili k temu, da bi našli 100 spermijev na preparat, vendar so bili spermiji tako redki, da smo jih skupaj na vseh preparatih našli 801. Število najdenih spermijev na preparat je predstavljeno v preglednici 10.

**Preglednica 10: Število najdenih spermijev na preparat**

Število najdenih spermijev na preparatu	0	1	2	3	4	5	6	11	14	15	16	17	21	25	50
Število preparatov	8	4	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	25	1

Vsek spermij smo ocenili glede na normalnost glave, vrata, srednjega dela in repa. Podatki o morfologiji spermijev se nahajajo v Prilogi C. Od skupaj najdenih 801 spermijev jih je bilo le 83 morfološko normalnih, kar je 10,3%, ostalih 718 je bilo morfološko nenormalnih, kar je 89,7%. Med nenormalnimi spermiji je bilo 650 (90,5%) takšnih, ki so imeli nepravilne glave, 42 (5,9%) jih je imelo nepravilen srednji del, 1 (0,1%) je imel nepravilen vrat in 25 (3,5%) jih je imelo nepravilen rep (preglednica 11).

**Preglednica 11: Delež normalnih in nenormalnih spermijev in deleži spermijev s posameznimi morfološkimi nepravilnostmi**

Morfologija	Število najdenih	Delež
Vseh spermijev	801	
Normalnih spermijev	83	10,3% (83/801)
Nenormalnih spermijev	718	89,7% (718/801)
<hr/>		
Spermiji z nepravilno glavo	650	90,5% (650/718)
Spermiji z nepravilnim srednjim delom	42	5,9% (42/718)
Spermiji z nepravilnim vratom	1	0,1% (1/718)
Spermiji z nepravilnim repom	25	3,5% (25/718)

V prilogi C so poleg morfologije spermijev predstavljeni tudi podatki o samem postopku ICSI in izidu postopka ICSI. Na teh podatkih smo naredili sledeče statistične obdelave.

Statistična obdelava podatkov z logistično regresijo ni pokazala nobenih statistično značilnih povezav med običajno morfologijo spermijev (delež morfološko normalnih spermijev v semenu), ocenjeno po merilih SZO, in izidom postopka ICSI (preglednica 12).

**Preglednica 12: Povezava med morfologijo spermijev in izidom postopka ICSI (logistična regresija)**

	Statistična značilnost (P)
	Delež normalnih spermijev
<b>Stopnja oploditve</b>	0,949
<b>Razvoj zarodkov vsaj do morule</b>	0,271
<b>Razvoj zarodkov vsaj do blastociste</b>	0,398
<b>Nosečnost</b>	0,768

Razlike so statistično značilne pri  $P < 0,05$ .

Statistična obdelava podatkov s Spearmanovim koeficientom korelacije pa je pokazala statistično značilno pozitivno povezavo med deležem morfološko nenormalnih spermijev v semenu oziroma deležem spermijev z nepravilnimi glavami in številom razvojno zaustavljenih zarodkov (preglednica 13) oziroma številom zarodkov, ki zaradi slabe kakovosti niso bili primerni za prenos po postopku ICSI. Pokazalo se je torej, da nepravilnosti glave negativno vplivajo na razvoj in kakovost zarodkov po postopku ICSI. Ostale morfološke nepravilnosti spermijev niso bile povezane z izidom ICSI.

**Preglednica 13: Povezava med morfologijo spermijev in izidom postopka ICSI (Spearmanov koeficient korelacijs)**

	Statistična značilnost (P)						
	Število zamrznjenih zarodkov	Število zavrnjenih zarodkov	Število prenesenih zarodkov	Število razvojno zaustavljenih zarodkov	Število morul	Stopnja oploditve	Delež normalnih spermijev
Delež normalnih spermijev	0,975	0,452	0,100	0,926	0,622	0,949	0,949
Delež nenormalnih spermijev	0,011*	0,276	0,438	0,008*	0,559	0,103	0,103
Delež spermijev z nepravilnimi glavami	0,022*	0,275	0,363	0,014*	0,619	0,135	0,135
Delež spermijev z nepravilnim srednjim delom	0,324	0,694	0,473	0,576	0,617	0,763	0,763
Delež spermijev z nepravilnim vratom	0,592	0,573	0,727	0,421	0,465	0,486	0,486
Delež spermijev z nepravilnim repom	0,261	0,904	0,316	0,281	0,385	0,691	0,691

Razlike so statistično značilne pri  $P < 0,05$ .

\* statistično značilna povezava

## 4.2 OCENA VPLIVA SELEKCIJE MORFOLOŠKO NORMALNIH SPERMIJEV (IMSI) NA IZID POSTOPKA ICSI

Po gradientnem centrifugiraju, spiranju in metodi splavanja na površje smo si na stekleni posodici naredili kapljice s spermiji, ki smo jih ocenjevali in izbirali pod 6000-kratno povečavo. Spermije smo prenesli v plastično posodico za selekcionirane spermije v 1 µl kapljice, v katerih jih je nato embriolog poiskal in injiciral v jajčne celice.

Postopek IMSI smo naredili pri 16 postopkih; pri 6 postopkih smo injicirali vse jajčne celice s spermiji, selekcioniranimi pod 6000-kratno povečavo, pri ostalih 10 pa smo manj kot polovico jajčnih celic injicirali s selekcioniranimi spermiji pod 6000-kratno povečavo, ostale jajčne celice so bile injicirane s spermiji, ki jih je embriolog izbral pod 400-kratno povečavo.

Indikacije bolnikov, ki so imeli postopek IMSI, so predstavljene v preglednici 14. Od 16 bolnikov jih je imelo 13 teratozoospermijo, samo ali pa v kombinaciji z drugo okvaro semena, kar je 81,25%. Od 16 bolnikov sta imela samo 2 astenoteratozoospermijo v kombinaciji z drugo okvaro semena, kar je 12,5%. Od 16 bolnikov jih je imelo 7 oligozoospermijo v kombinaciji z ostalimi okvarami semena, kar je 43,75%.

**Preglednica 14: Indikacije neplodnosti bolnikov, ki so imeli postopek IMSI**

Indikacija	Število bolnikov	Odstotek (%)
Endometriozra partnerice	2	12,5
Darovano seme	1	6,25
Teratozoospermija	5	31,25
Astenoteratozoospermija	1	6,25
Oligoteratozoospermija	6	37,5
Oligoastenoteratozoospermija	1	6,25
	16	

Za injekcijo smo izbirali spermije razreda I in II po Cassuto-Barak klasifikaciji. Spermijev razreda III za injekcijo nismo izbirali. Skupaj smo selekcionirali 104 spermije razreda I in II, od tega jih je bilo 12,5% razreda I in 87,5% razreda II (preglednica 15).

**Preglednica 15: Število najdenih spermijev razreda I in II po Cassuto-Barak klasifikaciji**

	Število
Skupaj najdeni spermiji razreda I in II	104
Spermiji razreda I	12,5 % (13/104)
Spermiji razreda II	87,5% (91/104)

Spermije razreda I smo lahko našli pri sedmih bolnikih (44 %), pri ostalih bolnikih (56%) pa smo lahko našli samo spermije razreda II. Spermije razreda III smo sicer našli pri vseh bolnikih, vendar le-teh nismo izbirali za injekcijo. Pri bolnikih s teratozoospermijo, samo ali v kombinaciji z ostalo okvaro semena, smo na bolnika našli približno 1,8 spermijev

razreda I in 6,5 spermijev razreda II. Podatki o številu in razredu spermijev pri posameznem bolniku so predstavljeni v preglednici 16.

V vsakem semenskem vzorcu imajo spermiji tipične morfološke nepravilnosti (Berkowitz in sod., 2005), zato so v preglednici 16 opisane morfološke nepravilnosti spermijev posameznega vzorca; prikazane so tudi slike spermijev, posnete s sistemom IMSI. Iz prejšnjega spermograma smo izpisali odstotek normalne morfologije spermijev. Navedeni pa so tudi medij, ki smo ga uporabili za upočasnitev spermijev (PVP medij ali SpermSlow<sup>®</sup>), indikacija bolnika, število najdenih spermijev razreda I in II in število spermijev, injiciranih v jajčne celice. Skupaj smo selekcionirali 104 spermije, od tega smo jih injicirali v jajčne celice 66 (63,5%). Odstotek morfološko normalnih spermijev se je gibal med 1% in 16%. Pri 4 vzorcih smo za upočasnitev spermijev uporabili medij PVP, pri 11 vzorcih smo uporabili medij SpermSlow<sup>®</sup>, pri enem bolniku pa medija za upočasnitev zaradi popolnoma negibljivih spermijev nismo uporabili.

V preglednici 17 so predstavljeni podatki o postopkih, jajčnih celicah (starost ženske, število izsesanih (aspiriranih) jajčnih celic, število injiciranih jajčnih celic), semenu partnerja (odstotek spermijev z normalno morfologijo, povzet iz prejšnjega spermograma, volumen semena, število in gibljivost spermijev, ocenjena na dan postopka) in o razvoju zarodkov med gojenjem do 5. dne (posebej za postopek ICSI in IMSI). Povprečna starost žensk je bila 32 let, skupaj je bilo izsesanih 152 jajčnih celic (9,5 jajčnih celic na žensko), od tega jih je bilo 116 (76,3%) injiciranih. Oplojenih jajčnih celic je bilo 70, kar je 60,3%, od teh se jih je 12 razvilo do razvojne stopnje morule, kar je 17,2%, in 18 do razvojne stopnje blastociste, kar je 25,7%.

V preglednici 18 so predstavljeni podatki o izidu postopkov IMSI in ICSI: stopnja oploditve in razvoj zarodkov - stopnja razvoja morul, stopnja razvoja blastocist, stopnja razvoja morul in blastocist in stopnja razvojno zaustavljenih zarodkov na 5. dan gojenja. Po postopku IMSI se je oplodilo statistično značilno manj jajčnih celic kot po postopku ICSI ( $P < 0,05$ ), kot smo izračunali s testom hi-kvadrat. Po postopku IMSI je bila tendenca po boljšem razvoju zarodkov do morule in slabšem razvoju do blastociste kot po postopku ICSI, vendar razlika ni bila statistično značilna.

V preglednici 19 so predstavljeni izidi postopkov IMSI glede na uporabljen medij za upočasnitev spermijev, in sicer PVP medij ali SpermSlow<sup>®</sup>. Stopnje oploditve in razvoja zarodkov so izračunane enako kot v preglednici 18. Vidimo lahko, da se ob uporabi medija PVP kljub dobri stopnji oploditve noben zarodek ni razvil do razvojne stopnje blastociste ali morule. Pri izvajanju postopka IMSI so se spermiji močno lepili na steno pipete, zato smo delo raje nadaljevali z medijem SpermSlow<sup>®</sup>, saj so se spermiji manj lepili na steno pipete in so se zarodki razvijali do razvojne stopnje blastociste oziroma morule. Kljub temu lahko opazimo, da se je po uporabi medija SpermSlow<sup>®</sup> in postopku IMSI oplodilo statistično manj jajčnih celic kot po postopku ICSI ( $P < 0,05$ ; test hi-kvadrat). Prav tako je bila po IMSI tendenca po slabšem razvoju zarodkov do blastociste, vendar razlika ni bila statistično značilna.

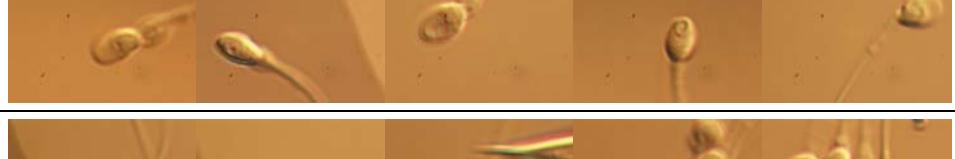
Pri uporabi SpermSlow<sup>®</sup> medija smo opazili 3 populacije spermijev, in sicer spermije, ki so se permanentno vezali (smo jih izbirali), spermije, ki se sploh niso vezali (jih nismo izbirali), in spermije, ki so se začetno vezali na hialuronsko kislino (HA), nato pa se odvezali in ponovno vezali (smo jih lahko izbrali).

**Preglednica 16: Morfologija spermijev, ocenjena s sistemom IMSI**

♂	I	% NM	ŠN	ŠI	MU	Opis morfologije spermijev	Reprezentativne slike vzorca semena
S.Š.	T	6-10	2 x II	2	PVP	Zelo slaba morfologija. Nepravilne oblike glav, baz, prisotnost velikih vakuol.	
S.B.	En	16	2 x I 2 x II	2	PVP	Zelo dobra morfologija. Normalne oblike glav, vidne predvsem velike vakuole ali pa več majhnih vakuol.	
J.P.	*	*	2 x II	1	PVP	Slaba morfologija. Vsi spermiji vakuolizirani, normalen ni bil opažen.	
V.J.	T	9	3 x I 3 x II	5	PVP	Dobra morfologija. Normalne oblike glav, prisotne manjše vakuole. Predvsem poškodovane baze. Morfologija tako dobra, da s polovico jajčnih celic naredijo klasični IVF.	
J.H.	T	13	5 x II	3	SS	Srednje dobra morfologija. Veliko dvorepih spermijev, nepravilnih srednjih delov, izboklin jedrne mase.	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

$\text{♂}$	I	% NM	ŠN	ŠI	MU	Opis morfologije spermijev	Reprezentativne slike vzorca semena
B.D.	T	16	1 x I 4 x II	3	SS	Tipična poškodba je nepravilen srednji del in veliko citoplazmatskih ostankov. 20% spermijev nevakuoliziranih.	
M.L.	AT	14	2 x I 6 x II	4	/	95% ima poškodovan srednji del in citoplazmatski ostanek, 10% je nevakuoliziranih. Veliko makrocefalnih glav. Vsi negibljivi.	
M.S.	OT	2	6 x II	4	SS	Ni normalnega spermija. Poškodbe srednjih delov v kombinaciji z nepravilnimi glavami. 5% nevakuoliziranih.	
D.H.	En	6	2 x I 2 x II	1	SS	Zelo dobra morfologija, normalne oblike glav, niso vakuolizirani. Vsekakor več kot 6% normalnih spermijev.	
A.J.	OT	7	3 x II	2	SS	10 % nevakuoliziranih, veliko spermijev ima citoplazmatski ostanek in nepravilne oblike glav.	
M.D.	T	4	2 x I 9 x II	4	SS	5% nevakuoliziranih. Značilni citoplazmatski ostanki, nekrotični spermiji in velike jedrne vakuole.	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

$\text{♂}$	I	% NM	ŠN	ŠI	MU	Opis morfologije spermijev	Reprezentativne slike vzorca semena				
R.Z.	OAT	2	5 x II	3	SS	Zalo slabo gibljeni, zelo redki, močno vakuolizirani, večina ima citoplazmatske ostanke.					
F.P.	OT	1	12 x II	10	SS	Zelo redki spermiji, majhne glave, 95% ima citoplazmatski ostanek.					
U.N.	OT	6	1 x I 3 x II	3	SS	Nepravilne vsaditve repov, 10% nevakuoiliziranih, večina ima citoplazmatske ostanke.					
L.I.	OT	10	12 x II	9	SS	Poškodba srednjih delov, mnogo izboklin jdrne mase, male glave, 100% vakuolizirani spermiji.					
A.C.	OT	5	15 x II	10	SS	Močno vakuolizirani, nepravilne oblike glav, poškodovane baze, večina s citoplazmatskim ostankom.					

LEGENDA:

$\text{♂}$ - ime bolnika oz. partnerja

I - indikacija

%NM - odstotek normalne morfologije spermijev,  
 odčitan iz spermograma

ŠN- število najdenih spermijev razreda I in II

ŠI- število injiciranih spermijev

MU- uporabljen medij za upočasnitev

PVP- polivinilpirolidon

SS- SpermSlow® medij

En- endometrizo partnerice

OT- oligoteratozoospermija

AT- astenoteratozoospermija

T- teratozoospermija

OAT- oligoastenoteratozoospermija

\*- darovano seme

JC- jajčne celice

I- spermij razreda I

II- spermij razreda II

**Preglednica 17: Podatki o postopku, jajčnih celicah, semenu ter razvoju zarodkov po postopku ICSI oz. IMSI**

Ime (♀ in ♂)	Postopek	Datum postopka	Mikromanipulacija																		
			Jajčne celice		Spermogram			0. dan		1. dan		2. dan		3. dan		4. dan		5. dan			
			IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI				
H.K. in S.Š.	2	9.3	34	13	8	6-10	2,2	30	70	7	1	7 2PN	1 2PN	1 2PN 3 2C 2 4C 1 6C	1 2C	2 10C 3 8C 1 6C 1 4C	1 2C	3 10C 2 8C 2 6C	1 2C	2 Bl (ET) 1 Bl (Z) 4 10C ex	1 2C ex
S.J. in S.B.	1	10.3	35	10	10	16	2,2	100	60	8	2	7 2PN 1 deg	1 2PN 1 deg	5 4C 2 2C	1 2C	1 7C 4 6C 2 4C	1 4C	2 8C 3 6C 2 5C	1 5C	2 10C ex 5 <10C ex	1 <10C ex
L.P. in J.P.	2	16.3	27	4 <sup>o</sup>	2	*	2	40	50	1	1	1 3PN	1 2PN	deg							
T.S. in V.J.	1	17.3	33	11	5	9	1,5	150	70	6	5	3 2PN 2 3PN 1 M I	3 2PN 2 neop	3 4C 1 2C 1 4C						1 Bl (ET) 1 Mo (ET) 1 ex	3 ex
J.H. in J.H.	2	23.3	37	15	12	13	2	40	80	9	3	6 2PN 3 deg	1 2PN 1 neop 1 deg	2 4C 2 3C 2 2C	1 2C					2 Bl (3bb,3ab) (ET) 1 Mo (Z) 3 ex	1 ex
K.K. in B.D.	4	30.3	29	8	8	16	1,5	80	80	5	3	5 2PN	2 2PN 1 ex	5 4C 1 4C 1 2C			3 6-8C 2 4C	1 8C 1 4C	1 Bl (3ab) (ET) 1 Bl (Z) 1 Mo (Z) 2 8C (Z)	1 Bl (4aa) (ET) 1 Bl (Z) 1 Mo (Z) 2 8C (Z)	
K.O. in M.L.	3	31.3	26	10	9	14	1	30	0	5	4	1 2PN 1 neop 3 deg	4 neop	1 4C		1 6C		1 8C		1 Mo (ET)	
A.S. in M.S.	1	1.4	29	9	7	2	3	10	90	5	2	3 2PN 2 neop	1 neop 1 deg	2 2C 1 3C					2 6C 1 8C	1 Bl (ET)	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Ime (♀ in ♂)	Postopek	Datum postopek	Spermogram						Mikromanipulacija												
			Jajčne celice		Morfologija (%normalnih)	Št. injiciranih JC	Št. izsesanih JC	Starost ženske	0. dan	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan							
			Volumen (ml)	Število ( $\times 10^6/ml$ )					Gibljivost (%)	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI	IMSI		
I.H. in D.H.	1	7.4	38	2	1	6	6	70	30		1	1 2PN		1 3C							
A.R. in A.J.	1	16.4	29	9	7	7	3	10	70	5	2	5 2PN	2 2PN	2 4C 2 3C 1 2C	1 4C 1 2C	2 8C 2 6C 1 3C	2 6C	4 Mo 1 <10	1 Mo 1 <10	2 Bl (4AA, 3AA) (ET), 2 Bl (3AA, 1-2) 1 ex	2 Bl (2, 1)
K.D. in M.D.	6	21.4	34	8	7	4	2	55	70		7	3 2PN 3 neop 1 3PN		3 frag						1 Mo (ET) 1 E (ET) 1 E ex	
M.B. in M.Z.	5	23.4	29	8	3	2	1		+		3	1 2PN 1 1PN 1 neop		2 2C						1 Mo (ET) 1 E (ET)	
S.F. in F.P.	3	23.4	33	13	10	1	4	5	70		10	5 2PN 1 1PN 4 neop		2 4C 3 2C						2 Bl (1, 1) (ET) 1 Mo 2 E ex	
S.N. in U.N.	1	29.4	31	8	8	6	1	20	80	5	3	2 neop 2 deg 1 GV	1 2PN 1 neop 1 deg	1 3C						1 Mo (ET)	
G.I. in L.I.	5	7.5.	37	9	9	10	1	20	80		9	6 2PN 1 1PN 2 neop		1 3C 5 2C						2 Mo (ET) 4 ex	
M.C. in A.C.	1	11.5	34	15	10	5	3	15	50		10	5 2PN 1 1PN 4 neop		2 4C 2 2C						2 Mo (ET) 2 E ex	

#### LEGENDA

JC- jajčna celica  
2PN- dva pronukleusa  
3PN- trije pronukleusi  
2/3/4/5/6/7/8/10C- dvo/tri/štiri/pet/šest/  
sedem/osem/deset celični zarodek

Mo- morula  
Bl- blastocista  
ET- prenos zarodkov v maternico  
Z- zamrznjen zarodek  
□ - odmrznjene JC

neop- neoplojena JC  
frag- fragmentacija  
+ - posamezni gibljivi in negibljivi  
deg- degenerirana JC  
podčrtano- narejen klasični IVF

\* - darovano seme  
GV- germinalni vezikel  
E- razvojno zaustavljen zarodek  
ex- zavrnjen zarodek

Opomba: S svetlo sivo barvo so označeni postopki, ki niso vključeni v izračun v preglednici 18 in 19. S temno sivo barvo so označeni postopki, pri katerih je bil na vseh JC narejen postopek IMSI.

**Preglednica 18: Izidi postopkov IMSI in ICSI**

Izid	ICSI	IMSI
Število postopkov	7	13
Povprečna starost žensk (leta)	32	33
Število vseh injiciranih jajčnih celic v postopku	44	56
Število oplojenih jajčnih celic na prvi dan gojenja	33	29
Število morul na peti dan gojenja	2	8
Število blastocist na peti dan gojenja	12	5
Število morul in blastocist na peti dan gojenja	14	13
Število prenesenih zarodkov	11	12
Število razvojno zaustavljenih zarodkov	16	15
Stopnja oploditve	<b>75% (33/44) *</b>	<b>52% (29/56)*</b>
Stopnja razvoja morul	6% (2/33)	28% (8/29)
Stopnja razvoja blastocist	36% (12/33)	17% (5/29)
Stopnja razvoja morul in blastocist	42% (14/33)	45% (13/29)
Stopnja razvojno zaustavljenih zarodkov	49% (16/33)	52% (15/29)

\*statistično značilna razlika ( $P < 0,05$ ), izračunana s testom hi-kvadrat.

(Izvzeli smo podatke o treh postopkih: postopek, pri katerem je bil poleg IMSI narejen klasičen IVF postopek, postopek, kjer so bile jajčne celice odmrznjene in postopek, pri katerem so bili vsi spermiji negibljivi (svetlo siva barva v preglednici 17). Tako smo pri izračunu upoštevali 13 poskusov IMSI).

**Preglednica 19: Izid postopka IMSI glede na uporabljen medij za upočasnitev spermijev (PVP vs. SpermSlow®)**

Izid	PVP	SpermSlow®	ICSI
Število vseh postopkov	2	11	7
Število vseh injiciranih jajčnih celic v postopku	3	53	44
Število oplojenih jajčnih celic na prvi dan gojenja	2	27	33
Število morul na peti dan gojenja zarodkov	0	8	2
Število blastocist na peti dan gojenja	0	5	12
Število morul in blastocist na peti dan gojenja	0	13	14
Število prenesenih zarodkov	0	12	11
Stopnja oploditve	66% (2/3)	<b>51% (27/53)*</b>	<b>75% (33/44)*</b>
Stopnja razvoja morul	0	30% (8/27)	6% (2/33)
Stopnja razvoja blastocist	0	18% (5/27)	36% (12/33)
Stopnja razvoja morul in blastocist	0	48% (13/27)	42% (14/33)

\*statistično značilna razlika ( $P < 0,05$ ), izračunana s testom hi-kvadrat.

(izvzeli smo enake postopke kot pri preglednici 18)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Predvsem je potrebno poudariti, da je bil v okviru tega dela postopek IMSI prvič izvajan tako na Ginekološki kliniki v Ljubljani kot tudi v Sloveniji. Ker ni bilo nobenih predhodnih izkušenj, gre za pionirsko delo, ki na nekatera vprašanja odgovarja, druga pa šele odpira.

Trenutno rutinsko uporabljeni morfološki kriteriji analize spermijev temeljijo na pregledu fiksiranih in barvanih spermijev. Splošno je sprejetoto, da morfološke lastnosti semena ne opišejo nujno kakovosti specifičnega spermija, ki se ga injicira v jajčno celico. Da smo preverili to trditev, smo morfološko ocenjevali obarvane preparate semena moških, ki so bili vključeni v postopek ICSI. Morfološko smo ocenili isti vzorec semena, s katerim je bil narejen postopek ICSI. Skupaj smo pregledali 52 preparatov. Pri vsakem preparatu smo se trudili najti 100 spermijev; ko je postalo jasno, da so spermiji zelo redki, smo jih poskusili najti vsaj 50. Pri večini bolnikov je bilo iskanje zaradi zelo redkih spermijev dolgotrajno, tako da je ocenjevanje enega razmaza trajalo tudi do dve uri. Po dveh urah iskanja smo prenehali z iskanjem, kljub temu, da nismo našli niti 50 spermijev. Morfološko smo ocenili 801 spermij. Pri 8 bolnikih kljub dolgemu iskanju nismo našli spermijev (preglednica 10). Izgleda, da so imeli bolniki poleg teratozoospermije tudi oligozoospermijo.

Od skupno 810 najdenih in ocenjenih spermijev jih je bilo le 10,3% morfološko normalnih (preglednica 11). Pri nenormalnih spermijih je bila najpogostejsa morfološka nepravilnost nepravilna morfologija glave (90,5%), zaradi česar lahko sklepamo, da je bil najpogostejsi vzrok neplodnosti moških nepravilnosti glav spermijev.

Pri statistični obdelavi podatkov ni logistična regresija pokazala nobene povezave med običajno morfološko oceno spermijev in izidom postopka ICSI: stopnjo oploditve, razvojem zarodkov do razvojne stopnje morule in blastociste in nosečnost (preglednica 12). Nato smo s Spearmanovim koeficientom korelacije še preverili, ali obstaja kakšna povezava med izidom ICSI in posameznimi morfološkimi nepravilnostmi spermija, to je nepravilno glavo, vratom, srednjim delom ali repom. Pokazalo se je, da sta bila število razvojno zaustavljenih zarodkov in število zarodkov, ki niso bili primerni za prenos v maternico ali zamrzovanje (zaradi slabe kakovosti), povezana z deležem nenormalnih spermijev oziroma deležem spermijev z nepravilno glavo. Pokazalo se je torej, da nepravilnosti glave negativno vplivajo na razvoj in kakovost zarodkov po postopku ICSI. Glava spermijev se je torej pokazala kot morfološko najbolj pomemben dejavnik izida postopka ICSI. To bi lahko povezali z morebitnimi nepravilnostmi jedra oziroma genetskega materiala v jedru spermijev.

Vsekakor je razlika, ali gledamo povezavo med običajno oceno morfologije spermijev v semenu in izidom ICSI ali pa povezavo med morfologijo injiciranega spermija in izidom ICSI; pri zadnjem se je izkazalo, da nenormalna morfologija poslabša stopnjo oploditve in nosečnosti (Tasdemir in sod., 1997). Pri postopku IMSI embriolog pod 6000-kratno povečavo poišče gibljiv spermij, ki ima morfološko normalen izgled, in če ima ta spermij normalno jedro in centriol, lahko oplodi jajčno celico, kljub temu, da je eden redkih v

semenu, ki ima normalen izgled. Pomembno pa je poudariti, da embriologu pod običajno – 400-kratno povečavo (slika 4) zaradi slabe ločljivosti in majhne povečave niso vidne mnoge morfološke nepravilnosti spermijev, poleg tega pa lahko spermiji vsebujejo poškodovano DNK; bolniki z OAT so namreč še bolj podvrženi poškodbam DNK. Vse to nakazuje na dejstvo, da so potrebni novi načini za oceno morfologije spermijev, predvsem pa selekcija spermijev pred postopkom ICSI.

Da smo podrobno ocenili morfologijo posameznega injiciranega spermija, smo uporabili novo metodo, ki se uveljavlja v laboratorijih OBMP po svetu in je še v fazi raziskovanja, tako imenovano metodo IMSI- neposredni vnos morfološko izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice, ki se drugače imenuje tudi »*high-magnification ICSI*« (Hazout in sod., 2006), ICSI pod veliko povečavo. Bistvo metode je v tem, da lahko pod 6000-kratno povečavo opazujemo tako zunanjost spermija, kot tudi vsebino njegovega jedra. Pod to povečavo so namreč vidne jedrne vakuole, ki naj bi odražale nenormalnosti DNK spermija. Spermij se na ta način oceni tako po obliki, kot tudi po kakovosti jedrne vsebine.

Za ocenjevanje spermijev obstaja več različnih klasifikacij, po katerih naj bi jih izbirali za injekcijo. Mi smo spermije ocenjevali po klasifikaciji Cassuto-Barak (Cassuto in sod., 2008). Pri spermijih smo se osredotočili na ocenjevanje treh delov, in sicer na obliko glave in baze ter odsotnost vakuol v glavi. Ta način klasifikacije spermijev se je izkazal kot primeren tudi za vsakodnevno klinično prakso.

Za injekcijo smo izbirali spermije razreda I in II (Preglednica 16; Priloga D). Če smo pod 6000-kratno povečavo našli samo spermije razreda III in ni bilo moč najti spermijev razreda I ali II, potem nismo naredili IMSI, ampak običajen postopek ICSI; s spermiji razreda III se namreč po petih dneh gojenja ne doseže stanja popolnoma razvite blastociste (Cassuto, 2009).

Pri Cassuto-Barak klasifikaciji se prisotnost več kot ene majhne vakuole v glavi spermija pri ocenjevanju šteje kot minus tri točke od skupno šestih možnih (2 za normalno obliko glave, 1 za normalno obliko baze in 3 za odsotnost vakuol ali za prisotnost ene majhne vakuole v glavi spermija). Iz te klasifikacije vidimo, da kakor ima spermij več kot eno majhno vakuolo, je uvrščen v razred II spermijev, kljub temu, da ima normalno obliko glave in baze. Vakuole imajo zato največjo težo pri izboru morfološko normalnega spermija; so celo bolj pomembne kot oblika glave spermija, saj spermij brez vakuol (ali z eno majhno) v glavi in z normalno oblikovano bazo, vendar nenormalno obliko glave, še vedno spada v razred I spermijev.

Pri večini bolnikov so bili spermiji v vzorcih semena močno vakuolizirani. Redkokdaj smo lahko našli popolnoma normalen spermij, z oceno 6, brez ene majhne vakuole. Če so bili vzorci močno vakuolizirani, smo izbirali spermije, ki so imeli vakuole v akrosomalnem delu in ne jedrnem delu glave spermija. Prav tako smo raje izbirali spermije, ki so imeli normalno jedrno vsebino, se pravi, da so bili brez vakuol, imeli pa so manjši citoplazmatski ostanek, nepravilno vsaditev repa in manjši akrosom. Citoplazmatski ostanek, nepravilna vsaditev repa in nepravilnosti akrosoma imajo namreč manjši vpliv na razvoj zarodkov kot pa vakuole (Cassuto in sod., 2008).

Pri iskanju smo vedno težili k temu, da bi našli popolnoma normalen spermij. Odvisno od stopnje poškodovanosti morfologije spermijev je bil čas za izbiro enega spermija med 5 in 30 min. Ko je postalno jasno, da ni moč najti spermija z normalno morfologijo (razred I), je bil izbran spermij razreda II. V takih primerih se je bilo težko odločiti, kdaj končati z iskanjem normalnega spermija. Najdba primernega spermija lahko vzame 30 min in več, to pa je tudi odvisno od števila jajčnih celic, ki jih je potrebno injicirati. Vsekakor je IMSI zamuden in zahteven postopek.

Pri opazovanju spermijev pod 6000-kratno povečavo je zelo pomembno, da se spermiji gibljejo čim bolj počasi, zato da lahko na zaslolu opazujemo njihovo morfologijo; v nasprotnem primeru izginejo iz zaslona. Za upočasnitev spermijev smo najprej uporabljali PVP medij. Z njegovo uporabo nismo nikoli dobili razvoja zarodka do blastociste, zato smo zaključili, da ima PVP toksičen vpliv na razvoj zarodkov. Za upočasnitev spermijev smo zato uporabili drug, bolj naraven medij, in sicer SpermSlow®, ki vsebuje hialuronsko kislino (HA), na katero se vežejo akrosomski receptorji, ki jih imajo samo zreli spermiji. Cayli in sod. (2003) so opisali tri vrste vezave spermijev na HA, in sicer: zreli spermiji z visoko gostoto HA receptorjev se vežejo na HA; nezreli spermiji z nezadostno zrelostjo in nezadostnim preoblikovanjem plazmatske membrane se ne vežejo na HA; in spermiji vmesne zrelosti z nizko gostoto HA receptorjev se vežejo samo prehodno. SpermSlow® se prvenstveno ne uporablja kot medij za upočasnitev spermijev, tako kot PVP, ampak se uporablja za selekcijo spermijev pred injekcijo - spermiji, ki se vežejo, naj bi bili zreli (Huszar in sod., 2007). S SpermSlow® smo tako poleg normalne morfologije spermija in normalne integritete DNK lahko delali selekcijo tudi na zrelosti spermija - hkrati smo delali trojno selekcijo. Večina Laboratorijev OBMP po svetu za upočasnitev spermijev uporablja medij PVP. Raziskovalna skupina, ki je za upočasnitev spermijev uporabila HA (medij SpermCatch®), je s postopkom IMSI dobila višjo stopnjo oploditve in stopnjo nosečnosti kot pri postopku ICSI (Junca in sod., 2004).

V preglednici 19 vidimo razliko med izidi IMSI postopkov glede ne uporabljen medij za upočasnitev. Stopnja oploditve je pri uporabljenem PVP mediju (66%) celo višja od stopnje oploditve pri SpermSlow® mediju (51%), vendar nismo pri PVP mediju dobili nobenega zarodka razvitega do razvojne stopnje morule ali blastociste, po uporabi SpermSlow® medija pa smo dobili 5 blastocist in 8 morul. Toksičnost PVP medija na razvoj zarodkov je potrebno še preveriti na večjem številu jajčnih celic, saj smo naredili zaključek le na 3 injiciranih jajčnih celicah. Ob uporabi medija SpermSlow® je bila stopnja oploditve jajčnih celic statistično slabša kot po običajnem postopku ICSI. Prav tako je bila po postopku IMSI in uporabi medija SpermSlow® tendenca po slabšem razvoju zarodkov do razvojne stopnje blastociste v primerjavi s postopkom ICSI, vendar razlika ni bila statistično značilna. Ker je bila selekcija spermijev optimalna, to kaže na to, da je medij SpermSlow® potencialno toksičen in bo potrebno v bodoče njegovo uporabo še optimizirati. Potrebno je razmislieti o boljšem spiranju spermijev po odvzemuh iz viskoznega medija za upočasnitev. Razmislieti je potrebno tudi o tem, da bi se spermij takoj po selekciji injiciral v jajčno celico; pri našem delu je embriolog pogosto injiciral selekcionirane spermije s časovnim zamikom.

Poleg tega, da so spermiji upočasnjeni, pa je pri izvajanju postopka IMSI zelo pomembna koncentracija spermijev. Prevelika koncentracija povzroča zamašitev pipete, saj nekateri

spermiji sami lezejo vanjo. Pomembno pa je tudi, da koncentracija ni premajhna, saj moramo imeti na razpolago dovolj spermijev, da lahko med njimi izbiramo. Metoda IMSI je že sama po sebi zamudna, zato je zelo pomembno, da ne izgubljamo časa še z iskanjem spermijev v kapljici. Priporočena koncentracija je 1000 spermijev/  $\mu\text{l}$  kapljice (Bartoov in sod., 2008). V Parizu, kjer postopek IMSI izvajajo že 3 leta, postopka ne izvajajo v primeru, če je koncentracija spermijev po čiščenju manjša od  $0,5 \times 10^6$  spermijev/ ml, kar je 500 spermijev/  $\mu\text{l}$  kapljice in so le-ti primerno gibljivi. V primeru, če je koncentracija manjša od 500 spermijev/  $\mu\text{l}$  kapljice, izvajajo običajni postopek ICSI (Cassuto, 2009).

Da zaradi vpeljave novega postopka ne bi poškodovali jajčnih celic, smo sprva delali IMSI na manj kot polovici jajčnih celic v postopku. S tem smo tudi zmanjšali vpliv jajčnih celic na izid postopka - videli smo lahko dejansko razliko med postopkom ICSI in IMSI. Vendar so bili v teh primerih izidi ICSI vedno boljši od izidov IMSI (preglednica 17). Možni vzroki za slabši izid postopka IMSI kot ICSI so sledeči:

- Potrebno je poudariti, da je bila selekcija spermijev v okviru te naloge izvajana prvič v Sloveniji in ni bilo nobenih prejšnjih izkušenj.
- Genetske napake spermijev ali jajčnih celic; kadar kljub zelo lepi morfologiji spermijev pod 6000-kratno povečavo in izboru normalnega spermija za injekcijo nismo dobili nobenega zarodka niti po postopku IMSI niti po postopku ICSI.
- Jajčne celice; večkrat so embriologi opozorili na slabo morfologijo le-teh.
- Lepljiv spermij; v večini primerov so se nam spermiji zelo lepili ali v pipeto ali pa na dno posodice, v kateri so bili posamični selekcionirani spermiji, zaradi česar smo se ga morali s pipeto večkrat dotakniti in smo ga lahko s tem nehote mehanično poškodovali, kar bi lahko bil vzrok za nesposobnost oploditve. V nekaterih primerih so jajčne celice degenerirale takoj po injekciji, saj je bilo potrebno zaradi zapečljenega spermija v pipeti le-to imeti dalj časa vstavljen v citoplazmi jajčne celice ali pa je bilo potrebno jajčno celico celo večkrat prebosti.
- Premalo narejenih postopkov IMSI, na katerih smo naredili zaključke izidov.

Velikokrat se rezultati spermiograma in dejanska morfologija spermijev pod mikroskopom nista ujemala. Morfologija spermijev se lahko namreč v času med narejenim spermiogramom in postopkom OBMP popravi ali pa poslabša. V nekaj primerih smo naleteli na boljšo morfologijo spermijev, kot smo jo pričakovali glede na predhodno opravljen morfogram; v takih primerih postopek IMSI ne bi bil potreben.

Stopnja oploditve po IMSI (52%) je bila nižja od stopnje oploditve po postopku ICSI (75%). Stopnja oploditve se naj nebi razlikovala med postopkoma IMSI in ICSI (preglednica 4), ampak naj bi bila stopnja oploditve po IMSI celo višja - višja kot je klasifikacija injiciranega spermija, višja je stopnja oploditve (Cassuto in sod., 2008). V našem primeru je lahko nižja stopnja oploditve posledica poškodbe spermija s pipeto zaradi lepljivosti. Opazili smo tendenco po boljšem razvoju zarodkov do razvojne stopnje blastociste po postopku ICSI (36%) kot po postopku IMSI (17%). Stopnja morul in blastocist je bila po postopku IMSI malenkost višja (45%) kot po postopku ICSI (42%), kar nakazuje, da je morfologija spermija pomemben dejavnik razvoja zarodkov.

Boljše izide IMSI kot ICSI bi morali dobiti že zaradi uporabe medija SpermSlow®, ki se nasprosto uporablja z namenom, da izboljša izide ICSI (Nasr-Esfahani in sod., 2008).

Glede na to, da smo izbirali morfološko najboljše spermije v semenu, poleg tega pa so bili le-ti vezani na HA, kar pomeni, da so bili zreli, bi lahko dobili boljše izide po postopku IMSI kot po ICSI. Najverjetnejše je bil vzrok za neuspeh v lepljivosti spermija v mikropipeti in manj optimalnem injiciraju spermija v jajčno celico.

Z običajnimi postopki ICSI smo dobili zelo dobre izide. Stopnja oploditve v Laboratoriju OBMP na Ginekološki kliniki v Ljubljani nasplošno je 65%, stopnja razvoja blastocist pa od 25% - 28% (Virant - Klun, 2009); mi smo dobili stopnjo oploditve 75%, stopnjo razvoja blastocist pa 36%. Od skupaj 7 prenosov v maternico, pri čemer smo prenesli 11 zarodkov, razvitih po postopku ICSI, je le ena ženska zanosila.

Uspeh IMSI postopka se je pokazal predvsem pri dveh bolnikih, in sicer v postopku, ko smo dobili bolj razvito blastocisto (4AA) po postopku IMSI kot po postopku ICSI, in v postopku, ko se je zarodek po IMSI razvil do razvojne stopnje morule, pri postopku ICSI pa smo dobili same razvojno zaustavljene zarodke.

Število poskusov IMSI je bilo premajhno, da bi lahko ugotavljal vpliv postopka IMSI na nosečnost.

Ker gre za novo metodo, indikacije za postopek IMSI še niso popolnoma definirane, o čemer poroča tudi Evropsko združenje za humano reprodukcijo in embriologijo, ESHRE (Excellence..., 2009). Raziskovalci navajajo različne indikacije za postopek IMSI (Bartoov in sod., 2003; Berkowitz in sod., 2005, 2006, 2006b; Jadrne vakuole, 2008, Cassuto in sod., 2007, 2008, 2009; Hazout in sod., 2006; Junca in sod., 2004):

- moško neplodnost,
- večkratni neuspeli poskus ICSI (najmanj 2 ali 3),
- večkratni neuspeli poskus klasične zunajtelesne oploditve ali ICSI poskus (najmanj 5),
- prisotnost hude teratozoospermije (< 5% ali < 10% ali < 14% normalne morfologije),
- starost ženske: ženske stare manj kot 36 ali 37 let,
- starost ženske: starejše ženske, stare 38 ali 40 let,
- neuspelo ugnezditve blastociste,
- visoko stopnjo fragmentacije DNK spermijev,
- idiopatsko neplodnost para,
- slab razvoj zarodka: če ni blastociste po klasičnem IVF ali ICSI,
- majhno število pridobljenih MII jajčnih celic,
- prisotnost jedrnih vakuol ob predhodni oceni spermijev s sistemom IMSI,
- veliko število spermijev (več kot 40%) razreda III po Cassuto-Barak klasifikaciji).

Iz preglednice 17 vidimo, da je prišlo po postopku IMSI do razvoja zarodkov do razvojne stopnje blastociste v treh postopkih, in sicer ko je bila normalna morfologija spermijev 1%, 3% in 16%, trenutni IMSI postopek pa je bil prvi, tretji in četrти postopek zunajtelesne oploditve. Na podlagi tega lahko preliminarno zaključimo, da so dobre indikacije za izvajanje postopka IMSI zelo slaba morfologija spermijev in večkratni neuspeli poskusi ICSI.

Postopek IMSI je zelo drag, dolgotrajen ter zahteva izkušenega embriologa, zato je včasih takojšnja uporaba IMSI neprimerna (npr. ali je smotrno uporabiti to metodo pri vseh

indikacijah moške neplodnosti). V Laboratoriju OBMP na Ginekološki kliniki v Ljubljani gre za vrhunsko usposobljene in izkušene embriologe, ki že 15 let izvajajo postopek ICSI (rojenih približno 2000 otrok), zato so rezultati tega dela korektni in zanesljivi (Virant - Klun, 2009).

Tesarik in sod. (2006) so ugotovili, da je pri neplodnih moških s porušeno integriteto DNK spermijev zelo primerna uporaba antioksidantov. Če je vzrok neplodnosti poškodba DNK spermijev, naj bi moški dva meseca pred novim poskusom ICSI oralno jemal antioksidante (vitamina C in E), kar v večini primerov zmanjša odstotek spermijev s fragmentirano DNK. Če se izkaže, da tudi v tem primeru ni izboljšanja, naj bi se naredil postopek IMSI (Tesarik in sod., 2006). Na Ginekološki kliniki v Ljubljani je opazno izboljšanje stanja integritete DNK spermijev po jemanju antioksidantov v posamičnih primerih (Virant-Klun, 2009).

Kljub temu, da še nismo dobili pričakovanih rezultatov in da smo zaključek naredili na zelo malo poskusih IMSI, lahko zaključimo, da morfologija spermijev vpliva na izid postopka ICSI, saj smo v nekaterih primerih z morfološko normalnimi spermiji, izbranimi pod 6000-kratno povečavo, dobili zarodke boljše kakovosti in višje razvojne stopnje kot pri poskusu ICSI. Tudi Odawara in sod. (2008) niso v začetnih poskusih IMSI dosegli pričakovanih rezultatov, kar so upravičili z nedefiniranimi indikacijami in nedokončno postavljivo sistema. Izgleda, da bomo izide IMSI izboljšali z uporabo medija za upočasnitev spermijev SpermSlow®, namesto medija PVP, in ob optimizaciji uporabe tega medija.

Uspešno smo postavili sistem, po katerem lahko v Laboratoriju OBMP na Ginekološki kliniki v Ljubljani izvajajo postopek IMSI; pri sami izvedbi postopka pa bi bilo zagotovo lažje, če bi ista oseba izvajala selekcijo in injekcijo spermijev pod istim mikroskopom (trenutno se to zaradi tehničnih razlogov izvaja na dveh ločenih sistemih). To je tema nadaljnjega razvoja in dodatne opreme, ki jo bo potrebno nabaviti.

V priloženem atlasu spermijev (Priloga D) smo prikazali spermije vseh razredov, I, II in III. Ocenili smo jih po Cassuto-Barak klasifikaciji; spermiji so bili ocenjeni z vsemi možnimi kombinacijami nepravilnosti glede na normalnost glave in baze ter prisotnost jedrnih vakuol. Poleg tega so predstavljene specifične morfološke nepravilnosti spermijev; večina večjih nepravilnosti (dvojni rep, makrocefalija, mikrocefalija, nepravilna vsaditev repa, poškodbe srednjega dela) je vidnih že pod 400-kratno povečavo, niso pa vidne nepravilne oblike baz, vakuole, nekrotični spermiji in izbokline jedrne mase. Pod močno deformiranimi spermiji so predstavljene najbolj skrajne oblike spermijev, na katere smo naleteli tekom selekcije spermijev. Atlas bo lahko v veliko pomoč pri nadalnjem delu in izvajanju postopka IMSI.

## 5.2 SKLEPI

Na izid postopka ICSI (število razvojno zaustavljenih zarodkov in število zarodkov slabe kakovosti, ki niso primerni za prenos v maternico ali zamrzovanje) vplivajo nepravilnosti glave spermijev v semenskem izlivu, ne pa nepravilnosti drugih delov spermija - vratu, srednjega dela ter repa. To nakazuje pomembnost selekcije spermijev na morfologijo glave za postopek ICSI. Morfologija posameznega spermija, ki je injiciran, vpliva na izid ICSI. IMSI izboljša rezultat ICSI v primerih, ko so spermiji v semenskem izlivu močno poškodovani (nizek odstotek morfološko normalnih spermijev) in kadar ima par za sabo že več neuspelih poskusov ICSI, vsekakor pa to zaenkrat še ni pravilo. Rezultate IMSI bomo izboljšali z uporabo medija za upočasnitev spermijev SpermSlow® in optimizacijo uporabe tega medija.

## 5.3 PRIHODNOST

Glavna prioriteta naslednjih raziskav je ugotoviti izvor, vsebnost in pomen vakuol spermijev. Ugotoviti bo potrebno, ali le-te resnično odražajo poškodbe DNK in kromatina in posledično vplivajo na razvoj zarodka in zdravje otrok. Postopek IMSI se kaže kot metoda, ki bo lahko v bodočnosti izboljšala rezultate zdravljenja najtežjih oblik moške neplodnosti. Velja pa tudi razmisli o IMSI kot o diagnostičnem postopku pregleda semena pred postopkom zunajtelesne oploditve.

## 6 POVZETEK

Najpogostejši vzrok moške neplodnosti je slaba kakovost semena. Ključna metoda zdravljenja moške neplodnosti je neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (ICSI), ki se izvaja, kadar je v semenskem izlivu malo spermijev, so slabo gibljivi (ali negibljivi) in kadar imajo spermiji slabo morfologijo.

Oploditvena sposobnost spermija, razvoj zarodka in zgodnji splav so odvisni od morfologije spermija in integritete njegove DNK.

Namen tega dela je bil oceniti morfologijo spermijev neplodnih moških, vključenih v postopek zunajtelesne oploditve in ugotoviti vpliv morfologije spermijev na izid postopka ICSI pri teh moških. Naredili smo razmaze semena, s katerim je bil narejen postopek ICSI, jih obarvali po Papanicolaou ter pod 1000-kratno povečavo določili morfologijo spermijev. Med običajno morfološko oceno spermijev (delež morfološko normalnih spermijev v semenu) in izidom postopka ICSI (stopnjo oploditve, razvojem zarodkov do razvojne stopnje morule in blastociste in nosečnostjo) ni bilo nobene povezave. Na izid ICSI (število razvojno zaustavljenih zarodkov in število zarodkov slabe kakovosti, ki niso primerni za prenos v maternico ali zamrzovanje) vplivajo nepravilnosti glave spermijev v semenskem izlivu, ne pa nepravilnosti drugih delov spermija- vratu, srednjega dela ter repa.

Pri moških z najtežjimi oblikami moške neplodnosti smo s posebno, novo, modificirano metodo ICSI, t.i. neposredni vnos morfološko izbranega spermija v citoplazmo jajčne celice (IMSI), selekcionirali spermije z normalno morfologijo in ugotavliali, če smo na ta način izboljšali rezultate postopka ICSI. Pri običajnem postopku ICSI se za injekcijo izbira normalno izgledajoč spermij pod 400-kratno povečavo, pod katero okvare finih struktur spermija ostanejo nevidne. Pri postopku IMSI pa se pod najmanj 6000-kratno povečavo izbira gibljive spermije, ki imajo normalno veliko ovalno glavo, ki nimajo vakuol v glavi in ki imajo normalno bazo. Vakuole, ki so vidne samo pod tem posebnim sistemom, so najverjetnejše odsev poškodb jedra in DNK spermijev. Pri metodi IMSI smo tako poleg oblike spermija opazovali tudi normalnost jedrne vsebine. Pri večini vzorcev semena smo našli močno vakuolizirane spermije. Za injekcijo smo izbirali spermije razreda I in II po Cassuto-Barak klasifikaciji. S temi selekcioniranimi spermiji smo injicirali jajčne celice ter opazovali razvoj zarodkov v primerjavi z razvojem zarodkov po običajnem postopku ICSI. Razvoj zarodkov do razvojne stopnje blastociste smo dosegli tudi pri bolnikih, ki so že prestali večkratne neuspele poskuse ICSI in pri katerih je bil odstotek morfološko normalnih spermijev nizek. Dobljeni rezultati so nakazali, da ima morfologija spermija pomemben vpliv na izid postopka ICSI.

Naredili smo tudi atlas morfologije spermijev, vidnih pod 6000-kratno povečavo, v katerem so predstavljeni spermiji razredov I, II in III po Cassuto-Barak klasifikaciji, specifične morfološke nepravilnosti spermijev ter močno deformirani spermiji.

V prihodnosti nas čaka se veliko dela na področju odkrivanja mehanizma nastajanja vakuol, njihove vsebine ter njihovega vpliva na razvoj zarodka.

## 7 VIRI

- Ainsworth C., Nixon B., Jansen R.P.S., Aitken R.J. 2007. First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. *Human Reproduction*, 22, 1: 197–200
- Aytoz A., Camus M., Tournaye H., Bonduelle M., Van Steirteghem A., Devroey P. 1998. Outcome of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection and the effect of sperm origin and quality on this outcome. *Fertility and Sterility*, 70, 3: 500-505
- Bar-Chama N., Schiff J., Luna M., Dann B., Copperman A., Barritt J. 2007. The level of sperm vacuoles in the fresh post-processed sperm sample significantly affects IVF cycle outcomes. *Fertility and Sterility*, 88, Issue null: S18-S18
- Bartoov B., Eltes F., Pansky M., Langzam J., Reichart M., Soffer Y. 1994. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Human Reproduction*, 9, 11: 2069-2075
- Bartoov B., Berkovitz A., Eltes F., Kogosowski A., Menezo Y., Barak Y. 2002. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *Journal of Andrology*, 23, 1: 1-8
- Bartoov B., Berkovitz A., Eltes F., Kogosovsky A., Yagoda A., Lederman H., Artzi S., Gross M., Barak Y. 2003. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertility and Sterility*, 80, 6: 1413-1419
- Bartoov B., Shmuel S., Schneider I. 2008. Intracytoplasmic morphology selected sperm injection (IMSI/BFS) - an advanced technique for ICSI. Eppendorf applications
- Berkovitz A., Eltes F., Yaari S., Katz N., Barr I., Fishman A., Bartoov B. 2005. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Human Reproduction*, 20, 1: 185-190
- Berkovitz A., Eltes F., Lederman H., Peer S., Ellenbogen A., Feldberg B., Bartoov B. 2006. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm Selection. *Reproductive Biomedicine Online*, 12, 5: 634-638
- Berkovitz A., Eltes F., Ellenbogen A., Peer S., Feldberg S., Bartoov B. 2006b. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Human Reproduction*, 21, 7: 1787–1790
- Berkovitz A., Eltes F., Paul M., Adrian E., Benjamin B. 2007. The chance of having a healthy normal child following intracytoplasmic morphologically-selected sperm

injection (IMSI) treatment is higher compared to conventional IVF–ICSI treatment.  
*Fertility and Sterility*, 88, Issue null: S20

Blastocista 4AA. 2009. Advanced Fertility Center of Chicago.

[Cassuto N.G., Plouchart J.M., Balet R. 2007. Interest of a new morphological classification of human spermatozoa for ICSI allowing to obtain a better blastocyst score. \*Human Reproduction\*, 22 \(Suppl. 1\): i113](http://www.google.si/imgres?imgurl=http://www.advancedfertility.com/images/4aa%2520blastocyst.jpg&imgrefurl=http://www.advancedfertility.com/blastocy.htm&usg=_uks7EvQGfMbr_KRSRi7GTpoaBc=&h=360&w=360&sz=11&hl=sl&start=17&tbnid=AULv3E5wALWhWM:&tbnh=121&tbnw=121&prev=/images%3Fq%3Dblastocyst%26hl%3Dsl%26sa%3DG, (16.4.2009)</a></p></div><div data-bbox=)

Cassuto N.G., Bouret D., Plouchart J.M., Jellad S., Vanderzwalm P., Balet R., Larue L., Barak Y. 2008. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertility and Sterility*: v tisku

Cassuto N.G., 2009. Postopek IMSI. Pariz. [guy.cassuto@labodrouot.com](mailto:guy.cassuto@labodrouot.com), (osebni vir, 25.1.-7.2.2009)

Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. 2003. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*, 7, 4: 462- 468

Celik-Ozenci C., Jakab A., Kovacs T., Catalanotti J., Demir R., Bray-Ward P., Ward D., Huszar G. 2004 Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction*, 19, 9: 2052-2059

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

De Vos A., Van De Velde H., Joris H., Verheyen G., Devroey P., Van Steirteghem A.C. 2003. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 79, 1: 42-48

Enginsu M.E., Dumoulin J.C., Pieters M.H., Bras M., Evers J.L., Geraedts J.P. 1991. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Human Reproduction*. 6, 6: 854-858

Evenson D., Wixon R. 2006. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Biomedicine Online*, 12, 4: 466-72

Excellence in IVF labs not an option but an obligation for safety and best results. 2009.  
ESHRE- European Society of Human Reproduction and Embriology: Focus on reproduction, 5: 19-21

Fernández-Gonzalez R., Moreira P., Pérez-Crespo M., Sánchez-Martín M., Ramírez M., Pericuesta E., Bilbao A., Bermejo-Alvarez P., Hourcade J., Fonseca F., Gutiérrez-Adán A. 2008. Long term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of Reproduction*, 78, 761–772

Franco J.G. Jr, Baruffi R.L., Mauri A.L., Petersen C.G., Oliveira J.B., Vagnini L. 2008. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*, 17, 1: 42-45

Gardner D.K., Lane M., Stevens J., Schlenker T., Schoolcraft W.B. 2000. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 73,6: 1155-1158

Garolla A., Fortini D., Menegazzo M., De Toni L., Nicoletti V., Moretti A., Selice R., Engl B., Foresta C. 2008. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reproductive Biomedicine Online*, 17, 5: 610-616

Gianaroli L., Magli M.C., Collodel G., Moretti E., Ferraretti A.P., Baccetti B. 2008. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertility and Sterility*, 90,1: 104-112

Gilbert S.F. 2006. Developmental Biology. 8.izdaja. Sunderland (MA), Sinauer Associates: 751 str.

Gómez E, Pérez-Cano I, Amorocho B, Landeras J, Ballesteros A, Pellicer A. 2000. Effect of injected spermatozoa morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Fertility and sterility*, 74, 4 :842-843

Gopalkrishnan K., Padwal V., Meherji P.K., Gokral J.S., Shah R., Juneja H.S. 2000. Poor quality of sperm as it affects repeated early pregnancy loss. *Archives of Andrology*, 45, 2: 111–117

Hazout A., Dumont-Hassan M., Junca A.M., Cohen Bacrie P., Tesarik J. 2006. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*, 12, 1: 19-25

Huszar G., Jakab A., Sakkas D., Ozenci C.C., Cayli S., Delpiano E., Ozkavukcu S. 2007. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reproductive BioMedicine Online*, 14, 5: 650–663

Jakab A., Sakkas D., Delpiano E., Cayli S., Kovanci E., Ward D., Revelli A., Huszar G. 2005. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with

- normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertility and Sterility*, 84, 6: 1665–1673
- Jedrne vakuole. 2008. Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie Univ. Prof. Dr. Zech.  
<http://www.ivf.at/Spindelanalyse/tabid/114/language/en-US/Default.aspx>, (8.4.2009)
- Jones G.M., Trounson A.O., Lolatgis N., Wood C. 1998. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 70, 6: 1022-1029
- Junca A., Cohen-Bacrie P., Hazout A. 2004. Improvement of fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic fine morphologically selected sperm injection. *Fertility and Sterility*, 82, Issue null: S173-S173
- Kahraman S., Akarsu C., Cengiz G., Dirican K., Sozen E., Can B., Guven C., Vanderzwalmen P. 1999. Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 14, 3 :726–730
- Katalinic A., Rösch C., Ludwig M. 2004. Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study *Fertility and Sterility*, 81, 6: 1604-1616
- 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
- Kruger T.F., Franken D.R., Menkveld R. 1993. Strict 1-2-3. A self teaching program for strict sperm morphology. Tygerberg - Capetown, South Africa: MQ Medical
- 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
- Loutradi K.E., Tarlatzis B.C., Goulis D.G., Zepiridis L., Pagou T., Chatzioannou E., Grimbizis G.F., Papadimas I., Bontis I. 2006. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 23, 2: 69-74
- Liu J., Nagy Z., Joris H., Tournaye H., Devroey P., Van Steirteghem A. 1995. Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Human Reproduction*, 10, 3: 626–629

- Liu D., Baker H. 2007. Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Human Reproduction*, 22, 6: 1597–1602
- Ludwig M., Katalinic A. 2003. Pregnancy course and health of children born after ICSI depending on parameters of male factor infertility. *Human Reproduction*, 18, 2: 351–357
- Lundin K., Söderland B., Hamberger L. 1997. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Human Reproduction*, 12, 12: 2676–2681
- Mansour R.T., Aboulghar M.A., Serour G.I., Amin Y.M., Ramzi A.M. 1995. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 64, 5: 982–986
- Miller J.E., Smith T.T. 2001. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Human Reproduction*, 16, 5: 918–924
- Morfologija spermijev. 2009. The Andrology Institute of America.  
[http://www.aia-zavos.com/strict\\_sperm\\_morphology.html](http://www.aia-zavos.com/strict_sperm_morphology.html), (14.4.2009)
- Moskovtsev S.I. 2008. Management of patients with high sperm DNA damage. *Indian Journal of Medical Research*, 127, 2: 101–103
- Nagy Z.P., Liu J., Joris H., Verheyen G., Tournaye H., Camus M., Derde M.C., Devroey P., Van Steirteghem A.C. 1995. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Human Reproduction*, 10, 5: 1123–1129
- Nagy Z.P., Verheyen G., Tournaye H., Van Steirteghem A.C. 1998. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Human Reproduction*, 13, Suppl 1: 143–154
- Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Vahdati A.A., Fathi F., Tavalaee M.J. 2008. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25, 5: 197–203
- Odawara Y., Hosaka T., Yoshii N., Kudo T., Abe A., Akimoto S., Takeda N. 2008. Outcome of ICSI with Morphologically Selected Spermatozoa. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25: 254–258
- Oehninger S., Chaturvedi S., Toner J., Morshedi M., Mayer J., Lanzendorf S., Muasher S. 1998. Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection? *Human Reproduction*, 13, 8: 2161–2164

- Oehninger S. 2001. Strategies for the infertile man. *Seminars in Reproductive Medicine*, 19, 3: 231-237
- Ozmen B., Koutlaki N., Youssry M., Diedrich K., Al-Hasani S. 2007. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reproductive Biomedicine Online*, 14, 3: 384-395
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340: 17-18
- Peer S., Eltes F., Berkovitz A., Yehuda R., Itsykson P., Bartoov B. 2007. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? *Fertility and Sterility*, 88, 6: 1589-1594
- Postopek ICSI. 2007. Harvard medical school teaching affiliate.  
[http://www.brighamandwomens.org/reproductivemedicine/treatments/crm\\_IVF.aspx](http://www.brighamandwomens.org/reproductivemedicine/treatments/crm_IVF.aspx)  
(20.5.2009)
- Purves W.K., Savada D., Orians G.H., Heller H.C. 2004. Life: The science of biology. 7.izdaja. Sunderland (MA), Sinauer Associates: 1121 str.
- Rawe V.Y., Terada Y., Nakamura S., Chillik C.F., Olmedo S.B., Chemes H.E. 2002. A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Human Reproduction*, 17, 9: 2344-2349
- Said T.M., Agarwal A., Zborowski M., Grunewald S., Glander H.J., Paasch U. 2008. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of Andrology*, 29, 2: 134-142
- Sakkas D., Seli E., Bizzaro D., Tarozzi N., Manicardi G.C. 2003. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, 7, 4: 428-432
- Shoukir Y., Chardonnens D., Campana A., Sakkas D. 1998. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Human Reproduction*, 13, 6: 1632-1637
- Svalander P., Jakobsson A.H., Forsberg A.S., Bengtsson A.C., Wikland M. 1996. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to "strict criteria" sperm morphology. *Human Reproduction*, 11, 5: 1019-1022
- Sukcharoen N., Sithipravej T., Promviengchai S., Chinpisal V., Boonkasemsanti W. 1998. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 69, 3: 564-568
- Sun F., Ko E., Martin R.H. 2006. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4: 1

- Tasdemir I., Tasdemir M.M., Tavukcuoglu S., Kahraman S., Biberoglu K. 1997. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Human Reproduction*, 12, 6: 1214–1217
- Tesarik J., Mendoza C., Greco E. 2002. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*, 17, 1: 184-189
- Tesarik J., Greco E., Mendoza C. 2004. Late but not early paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 19, 3: 611–615
- Tesarik J. 2005. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproductive BioMedicine Online*, 10, 3: 370-375
- Tesarik J., Mendoza-Tesarik R., Mendoza C. 2006. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*, 12, 6: 715-721
- Toshimori K., Chizuru I. 2008. Human Sperm Ultrastructures and Fertility. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25, 4:232-239
- Ultramorfologija spermija. 2008. Zygote Media Group, Inc.  
[http://www.3dscience.com/img/Products/3D\\_Models/Biology/Cells/Sperm\\_Egg/3d\\_human\\_reproductive\\_cells\\_web01.jpg](http://www.3dscience.com/img/Products/3D_Models/Biology/Cells/Sperm_Egg/3d_human_reproductive_cells_web01.jpg) , (6.4.2009)
- Van Steirteghem A. 1997. Intracytoplasmic sperm injection. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 11, 4: 725- 738
- Van Steirteghem A.C., Devroey P., Liebaers I. 2002. Intracytoplasmic sperm injection. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 186: 199–203
- Van Steirteghem A.C., Nagy Z., Joris H., Liu J., Staessen C., Smitz J., Wisanto A., Devroey P. 2003. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 8, 7: 1061-1066
- Vanderzwalmen P., Hiemer A., Rubner P., Bach M., Neyer A., Stecher A., Uher P., Zintz M., Lejeune B., Vanderzwalmen S., Cassuto G., Zech N.H. 2008. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reproductive Biomedicine Online*, 17, 5: 617-627
- Virant - Klun I. 2004. Ta čudoviti zarodek: atlas spolnih celic in zarodkov pri zunajtelesni oploditvi. Ljubljana, samozal.: 135 str.
- Virant - Klun I. 2009. Oploditev z biomedicinsko pomočjo. Ljubljana. [irma.virant@kclj.si](mailto:irma.virant@kclj.si), (osebni vir, maj 2009)

Virant - Klun I., Meden - Vrtovec H., Tomaževič T. 2002a. 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.

Virant - Klun I., Tomaževič T., Meden - Vrtovec H. 2002b. Sperm singlestranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilisation and quality of ICSI-derived embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 19, 7: 319-328

Virro M., Larson-Cook K., Evenson D. 2004. Sperm chromatin structure assay (SCSA<sup>®</sup>) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, 81, 5: 1289-1295

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 1999. 4.izdaja. Cambridge, Cambridge University Press: 106 str.

## ZAHVALA

V prvi vrsti gre zahvala moji somentorici, doc. dr. Irmi Virant-Klun, ki me je ves čas vodila in mi vseskozi stala ob strani, me vzela pod svoje okrilje in me uvedla v čudoviti svet oploditve z biomedicinsko pomočjo. Hvala za vso dragoceno znanje, nasvete, spodbude ter neposredno pomoč pri pisanju naloge. Hvala za večni optimizem, zaupanje, razumevanje in vse lepe besede. Hvala za vaš čas, ki ste si ga vzeli zame! Hvala, ker ste verjeli vame, ker ste mi dali možnost odhoda v Pariz, s čimer sem dobila neprecenljive izkušnje. Najlepša hvala za vse!

Iskrena zahvala tudi mojemu uradnemu mentorju, doc. dr. Miomirju Kneževiču, ker me je navdušil za medicinsko biotehnologijo, ker je brez težav sprejel mentorstvo ter me povezal z doc. dr. Irmo Virant-Klun, mi pomagal pri formalnostih in nikoli odklonil kakršnekoli potrebne pomoči.

Zahvala tudi recenzentu prof. dr. Gregorju Majdiču za strokovni pregled naloge ter pomoč pri prevodih strokovnih izrazov.

Hvala tudi gospem iz Laboratorija za oploditev z biomedicinsko pomočjo na Ginekološki kliniki v Ljubljani, ki so mi bile vedno pripravljene pomagati, ki so mi dajale nasvete, me nasmejale ter me lepo sprejele medse. Hvala gospe Lili Bačer- Kermavner, gospe Jožici Mivšek, gospe Brigit Valentinčič- Gruden in gospe Jerneji Kmecl. Hvala tudi gospe Mojci Kolbezen-Simoniti, vodji Androloškega laboratorija, za pomoč pri učenju in izvedbi ocenjevanja morfologije spermijev. Zahvala tudi prof. dr. Branku Zornu, ker me je povezal z laboratorijem OBMP v Parizu. Hvala gospe Klementi Habjan, ki mi je priskrbela tisoč in en članek ter hvala gospodu Ivanu Verdeniku za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Posebna zahvala gre tudi gospodu Guy-u Cassutu, vodji laboratorija OBMP v Parizu, ker me je sprejel v svoj laboratorij. Hvala tudi biologinji, gospe Dominique Bouret, s katero sva vsak dan ponavljali pozicije na mikromanipulatorju. Zahvala Karin, ki je vsak dan skrbela za moje dobro počutje v laboratoriju in ker je odgovarjala na vsa moja vprašanja.

Nenazadnje pa zahvala mojim staršem, sestri in bratu - super ste. Hvala za vse spodbudne besede in za to, ker brezpogojno verjamete vame. Hvala za finančno pomoč za pot v Pariz in za vse skrbi, ki so prišle zraven. Še posebna hvala mamici za vsestransko pomoč pri izdelavi naloge. Zahvala mojemu fantu Aljažu za vso podporo, tolažbo, razumevanje in hvala, ker me imas rad in me sprejemaš takšno kot sem. Lepa hvala tudi podjetju Final Pasarič d.o.o. za finančno pomoč pri potovanju v Pariz.

Hvala mojim trem kolegicam, Urški, Mojci in Lidiji, s katerimi smo skupaj prevedrile ta čudovita 4 leta študija biotecnologije in od katerih sem se marsikaj naučila. Hvala za smeh, medsebojno pomoč, nasvete in vse kavice.

Hvala vsem, ki ste kakorkoli drugače pomagali pri nastanku tega dela in ste mi dali priložnost.

## PRILOGA A

### Laboratorijski obrazec za spremiogram

Priimek: .....  
Ime: .....  
Št. kartona: .....

univerzitetni  
klinični center Ljubljana  
SPS GINEKOLOŠKA KLINIKA  
GINEKOLOŠKE AMBULANTE  
Šlajmerjeva 2  
1000 Ljubljana

**PREGLED SEMENSKEGA IZLIVA**

Odvzem dne: ..... ura: ..... Pregled - ura: .....

Spolni post: ..... dni.

Količina ( $> 2,0$  ml) ..... pH (7,2 - 8,0): .....

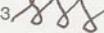
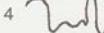
Barva (bledorumen): belkasta, bledorumen, gnojna, krvava, vodena

Utekočinjenje (končano): da ne Viskoznost (0): 0, 1, 2, 3, 4,

V smeri gibljivih semenčic - hitro ( $> 0,25$ ) .....  Na mesti giblj. sem. ....  
- počasi ..... Negibljivih sem. ....

Vitalnost: neobarvanih - živih ( $> 0,75$ ) ..... barvanih ( $< 0,25$ ) .....

Stopnje gibljivosti (3,4): 0, 2, 3, 4

Oblike gibanja (1, 2): 1,  2,  3,  4,  zlepiljene glave, repi, mešano

Aglutinacija semenčic: .....

Koncentracija semenčic ( $> 20 \times 10^9 / L$ ) .....  
Število semenčic ( $> 40 \times 10^6$ ) .....

Morfologija: normalnih ( $> 0,30$ ) .....  
nenormalnih .....  
nepravilne glave .....  
nepravilni vrat .....  
nepravilni srednji del .....  
nepravilni rep .....  
nezrele razvojne oblike ( $< 0,02$ ) .....

Levkociti ( $< 1 \times 10^9 / L$ ) ..... Okrogle celice .....

Bakterije ..... Paraziti .....

Bakteriološki pregled .....

Fruktosa ( $> 8,3$  mmol/L ali  $> 1500$  ug/ml) .....

Odmrznitveni test: delež gibljivih semenčic po odmrznitvi .....

Imunološki test: MAR IgG ..... MAR IgA .....

Testna kapacitacija .....

Dolgoživost po 24<sup>h</sup> .....

Dg. ejakulata: .....

KC št. identa 5501778

Tisk KRO, d.o.o.

## PRILOGA B

### Laboratorijski obrazec za postopek zunajtelesne oploditve

klinični center ljubljana  
University Medical Centre Ljubljana  
SPS GINEKOLOŠKA KLINIKA  
LJUBLJANA

Stajnejeva 3, 1525 Ljubljana  
Telefon: +386 (01) 54 03 101, 43 34 333, 43 35 177  
Teledax: +386 (01) 54 01 110

#### LABORATORIJSKI OBRAZEC ZA POSTOPEK ZUNAJTELESNE OPLODITVE ZA LABORATORIJ

PRIIMEK IN IME..... PARTNER.....

LETO ROJSTVA:..... ŠT. KARTONA.....

ZAP.ŠT. / ŠT.POSTOPKA:.....

DIAGNOZA: Ž: 1 2 3 4 5 6 7 8  
M: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13      morf:..... %

STIMULACIJA	SUPREFACT	št. ampul.....	GONAL F	št. ampul....
	CETROTIDE	št. ampul.....	MENOPUR	št. ampul....
E2.....	DIPHHERELINE	št. ampul.....	MENOGON	št. ampul....
			PUREGON	št. ampul....

DELNA PUNKCIJA FOLIKLOV: datum:..... SPONTANI CIKLUS

METODA: IVF ICSI TESE / TESA / PESA

ULTRAZVOČNA PUNKCIJA FOLIKLOV: Datum:....., Ura:.....

Št. pridobljenih celic:..... Ginekolog:..... Sestra: .....

SEME: sveže odmrznjeno ČAS OPLODITVE: .....

Ura oddaje ali odmrznitve: .....

Volumen:..... ml NAČIN PRIPRAVE

Koncentracija:.....  $\times 10^6$ /ml Spiranje:.....

Gibljivost:..... % swim up Pure Sperm PS+swim up  
Levkociti:..... ( $\times 10^6$ /L/ml)

TKIVO MOD ALI NADMODKA: sveže odmrznjeno št. ampul:.....

Število semenčic:

Gibljivost semenčic:

PRENOS ZARODKOV V MATERNICO:

ZAMRZOVANJE ZARODKOV:

Datum:..... Ginekolog:..... Biolog:.....  
Št. prenesenih zarodkov:.....

Št ..... K..... Ročka..... zg sp Tulček ..... Slamica .....

Datum:

Št ..... K..... Ročka..... zg sp Tulček ..... Slamica .....

Prva stran obrazca; tu se vpišejo podatki o postopku OBMP, o ultrazvočno izsesanih (aspiriranih) jajčnih celicah, o semenu, o prenosu zarodkov v maternico in o zamrzovanju zarodkov.

D: \_\_\_\_\_ L: \_\_\_\_\_

Priimek: \_\_\_\_\_

punktati oocyte					
	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan
1	<input type="radio"/>				
2	<input type="radio"/>				
3	<input type="radio"/>				
4	<input type="radio"/>				
5	<input type="radio"/>				
6	<input type="radio"/>				
7	<input type="radio"/>				
8	<input type="radio"/>				
9	<input type="radio"/>				
10	<input type="radio"/>				
11	<input type="radio"/>				
12	<input type="radio"/>				
13	<input type="radio"/>				
14	<input type="radio"/>				

Druga stran obrazca; tu se po dnevih rišejo razvojne stopnje zarodkov.

## Priloga C

## Preglednica :Morfogram spermijev in izid postopka ICSI

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

		stopnja razvoja blastocist											
		stopnja oploditve											
		nosečnost											
		št. zamrznjenih zarodkov	3	0	0	58	18						
		št. zavrnjenih zarodkov											
P.	28.2.	0	0	0	0	0	0	32	19	2	0	6	
Ž.	5.3.	25	0	25	25	0	0	0	28	8	0	0	63
R.	28.2.	0	0	0	0	0	0	31	11	2	1	2	60
T.	28.2.	25	5	20	19	1	0	0	40	5	1	1	17
M.	27.2.	15	3	12	9	1	0	2	33	11	0	1	40
M.	2.3.	25	1	24	24	0	0	0	33	9	0	3	25
G.	25.2.	17	1	16	16	0	0	0	36	6	0	0	83
G.	26.2.	11	0	11	7	3	0	1	39	7	1	0	0
I.	13.3.	2	1	1	1	0	0	0	39	1	0	0	57
B.	12.3.	25	1	24	22	2	0	0	33	8	0	3	0
H.	11.3.	25	2	23	20	2	0	1	39	4	1	0	0
P.	11.3.	0	0	0	0	0	0	30	5	0	1	4	0
U.	11.3.	4	0	4	4	0	0	0	31	6	0	0	50
H.	11.3.	1	0	1	1	0	0	0	35	3	1	0	20
G.	7.3.	3	0	3	3	0	0	0	28	13	1	1	67
J.	9.3.	6	1	5	2	2	0	1	40	4	0	2	50
S.	17.3.	25	4	21	17	3	0	1	34	22	1	4	7
Š.	18.3.	25	0	25	25	0	0	0	30	13	0	0	0
		razvojna stopnja ET											
		št. E											
		št. morul											
		št. blastocist											
		št. oplojenih JC											
		št. injiciranih JC											
		(GV, M I)											
		št. degeneriranih JC											
		št. aspiriranih JC											
		starost ženske											
		nepravilen rep											
		nepravilen vrat											
		nepravilen srednjí del											
		nepravilna glava											
		št. nenormalnih spermijev											
		št. normalnih spermijev											
		št. najdenih spermijev											
		datum postopka (2008)											
		♂											

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

		stopnja razvoja blastocist										stopnja oploditve	nosečnost	stopnja razvoja blastocist	stopnja oploditve																	
		št. zamrznjenih zarodkov										št. zavrnjenih zarodkov	št. prenesenih zarodkov	razvojna stopnja ET	št. E	št. morul	št. blastocist	št. oplojenih JC	št. injiciranih JC	št. nezrelih JC (GV, M1)	št. degeneriranih JC	št. aspiriranih JC	starost ženske	nepravilen rep	nepravilen vrat	nepravilen srednjí del	nepravina glava	št. normalnih spermijev	št. normalnih spermijev	št. najdenih spermijev	datum postopka (2008)	♂
M.	17.3.	25	3	22	21	1	0	0	30	6	0	1	5	5	2	0	1	3	2	0	1	57	40									
A.	16.3.	2	0	2	2	0	0	0	36	7	1	0	7	4	2	0	2	3	2	2	0	1	57	50								
P.	20.3.	25	4	21	18	2	0	1	30	10	1	3	7	4	0	2	2	2	2	2	0	0	57	0								
Š.	21.3.	25	2	23	20	3	0	0	39	17	7	1	16	5	0	2	3	2	2	3	0	0	31	0								
T.	21.3.	0	0	0	0	0	0	0	39	5	0	1	4	3	2	0	1	3	2	1	0	0	75	67								
K.	23.3.	25	5	20	16	4	0	0	38	10	1	3	7	6	0	2	4	2	2	4	0	0	86	0								
M.	28.3.	25	0	25	25	0	0	0	23	9	0	1	8	6	0	1	5	2	2	4	0	0	75	0								
V.	27.3.	25	0	25	25	0	0	0	29	12	1	0	12	8	0	1	7	2	2	6	0	0	67	0								
K.	7.4.	4	1	3	3	0	0	0	40	4	0	0	4	3	1	1	1	3	2	1	0	1	75	33								
M.	3.4.	25	0	25	23	2	0	0	35	12	2	0	12	8	2	0	6	3	2	6	2	1	67	25								
Š.	1.4.	25	3	22	19	3	0	0	38	7	0	2	5	3	0	2	1	2	2	1	0	0	60	0								
L.	31.3.	25	3	22	20	2	0	0	24	8	1	1	7	4	0	1	3	2	2	2	0	1	57	0								
S.	1.4.	25	0	25	25	0	0	0	35	7	0	2	5	2	0	1	1	2	2	0	0	0	40	0								
N.	31.3.	25	0	25	25	0	0	0	37	3	0	1	2	1	1	0	0	3	1	0	0	1	50	100								
D.	31.3.	25	1	24	24	0	0	0	36	8	1	1	7	4	0	1	3	2	2	2	0	0	57	0								
M.	10.4.	25	2	23	23	0	0	0	31	3	0	0	3	3	0	2	1	2	2	1	0	0	100	0								

LEGENDA

razvojna stopnja ET- razvojna stopnja prenesenih zarodkov; 3- prenos blastocist, 2- prenos morul, 1- prenos razvojno zaustavljenih zarodkov  
 nosečnost; 1- je nosečnost, 0- ni nosečnosti

stopnja oploditve; je izračunana kot število oplojenih JC na število injiciranih JC

stopnja razvoja blastocist; je izračunana kot število razvitih blastocist na število oplojenih JC

št. E- število razvojno zaustavljenih zarodkov

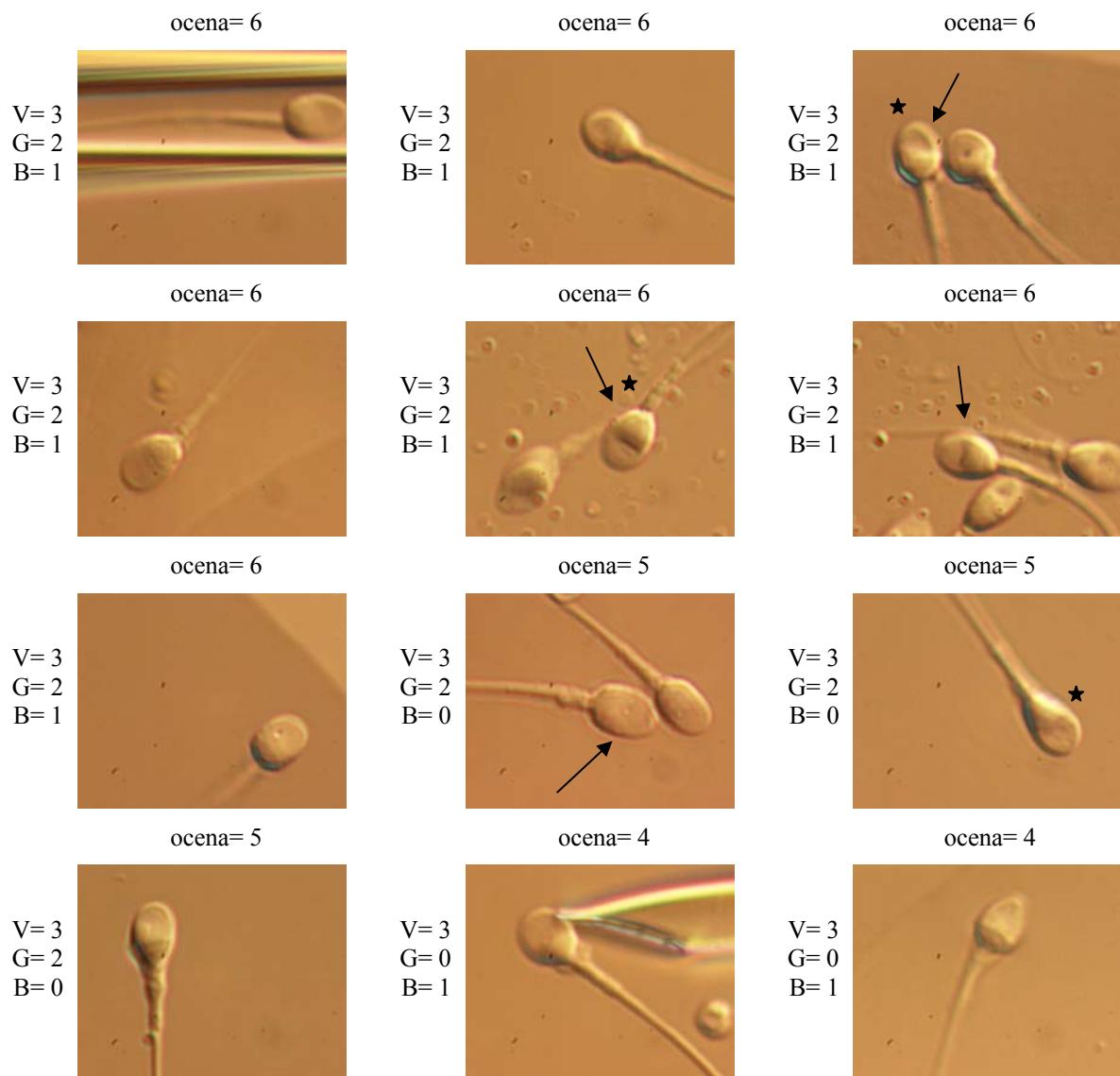
## PRILOGA D

### Atlas morfologije spermijev, ocenjene s sistemom IMSI

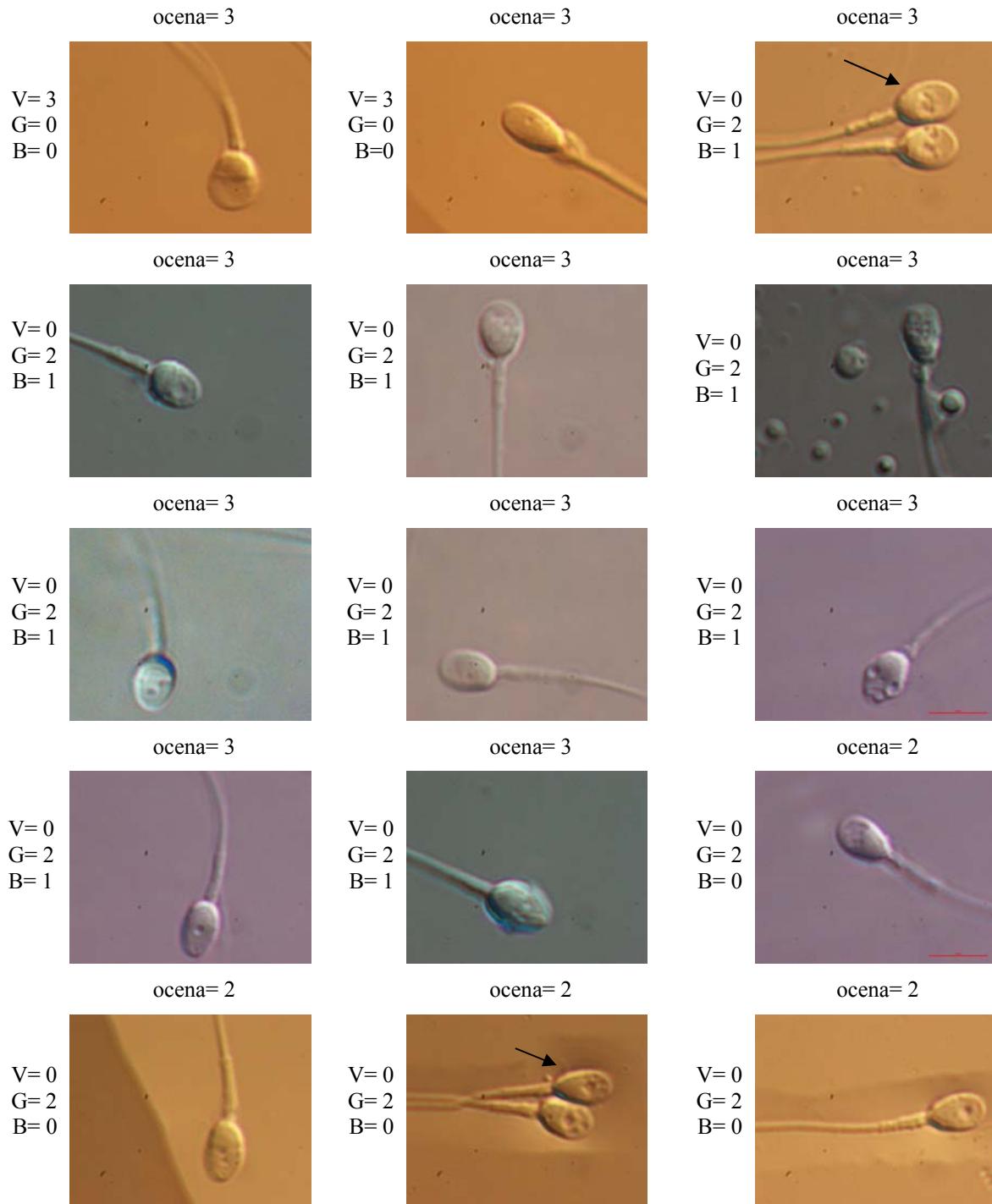
#### Spermiji, ocenjeni po Cassuto-Barak klasifikaciji

(V - vakuole, G - glava, B - baza)  
6000-kratna povečava

#### RAZRED I (ocena 6-4)

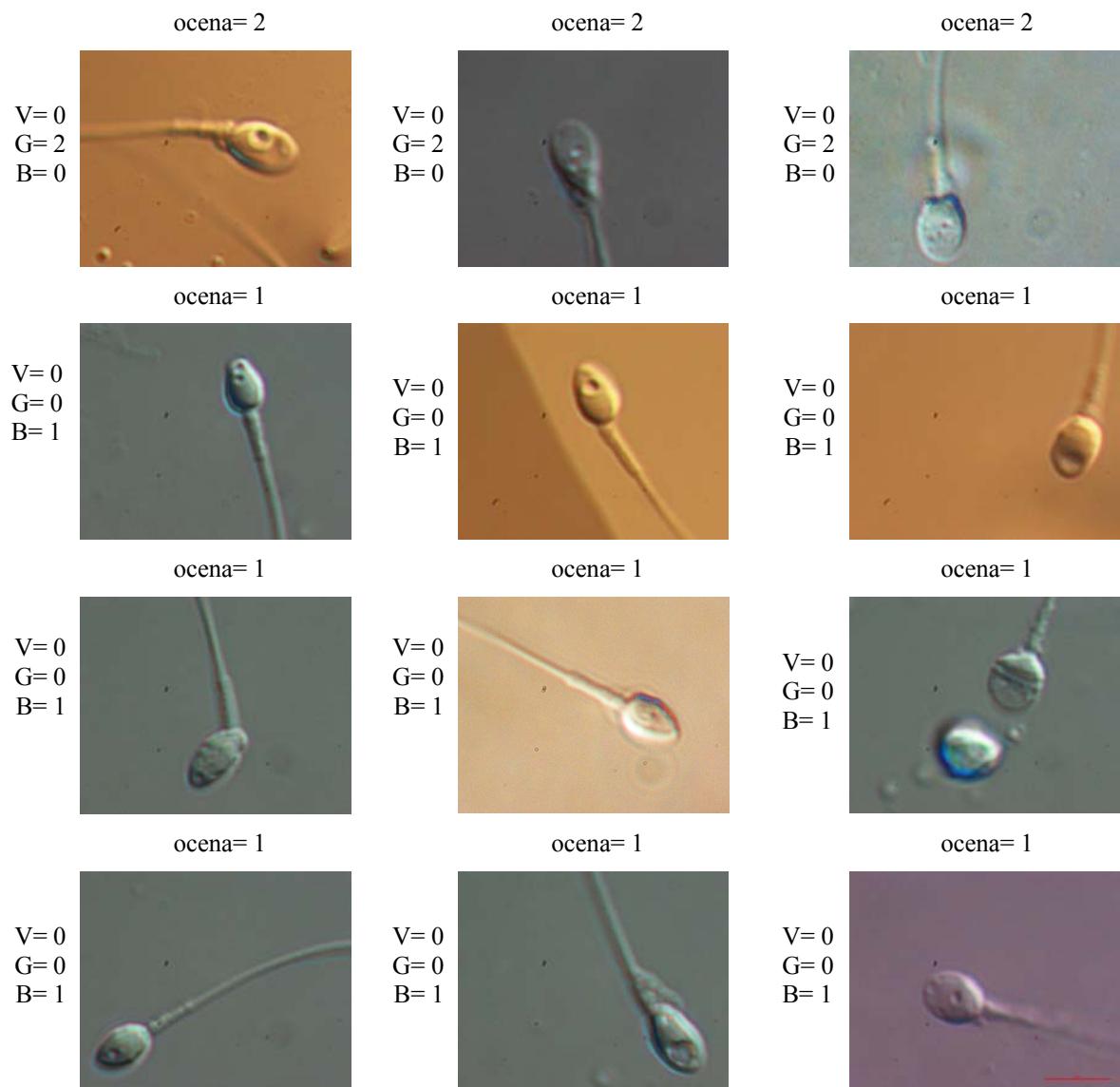


**RAZRED II**  
(ocena od 3-1)

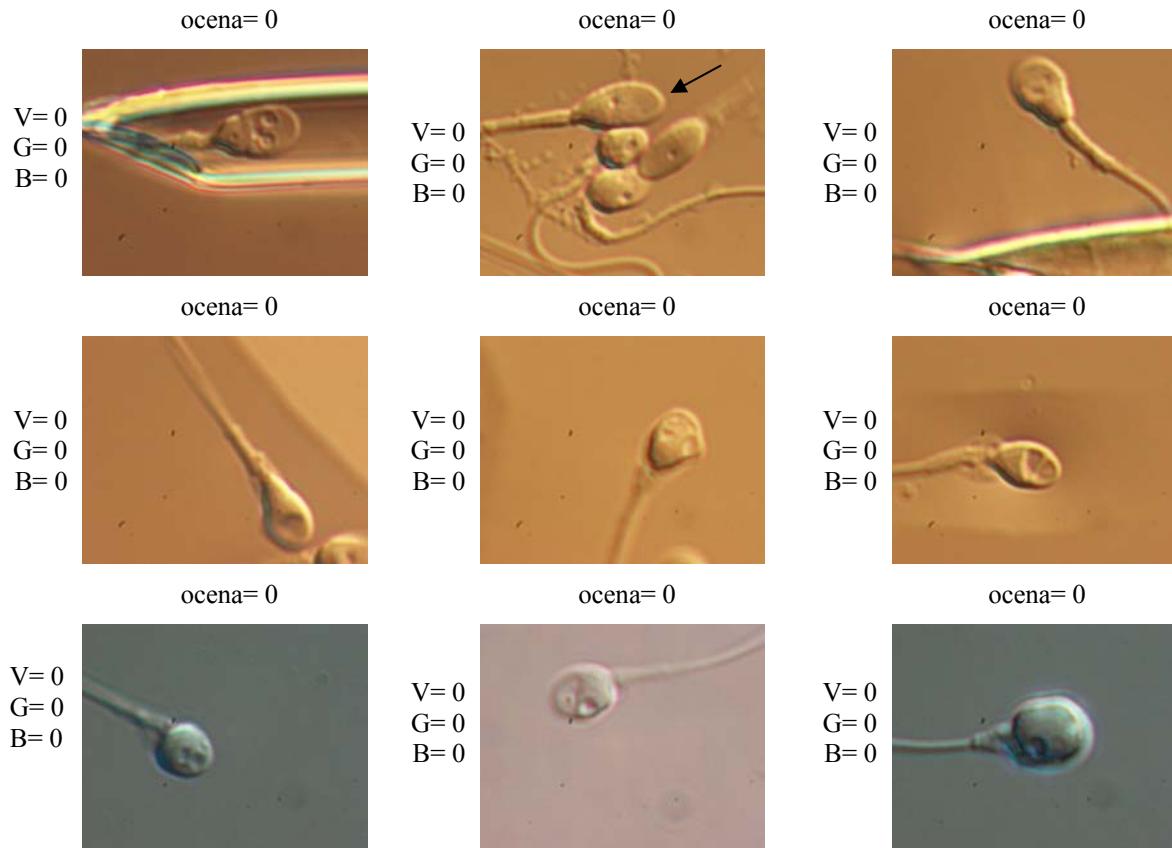


Se nadaljuje.

Nadaljevanje.



**RAZRED III**  
(ocena 0)



**LEGENDA**

V - vakuole

G - glava

B - baza

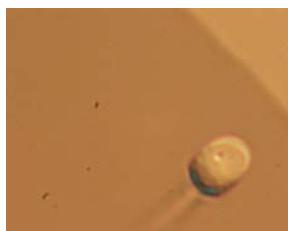
★ - spermij ima izpraznjen akrosom

Če je na sliki več spermijev, je ocenjen označen s puščico.

### Specifične morfološke nepravilnosti spermijev

(poleg opisane nepravilnosti imajo spermiji tudi ostale nepravilnosti)

majhna vakuola



vakuola na meji med veliko in majhno



velika vakuola



zelo velika vakuola



velika vakuola v jedrnem delu



zelo velike vakuole v akrosomalnem delu



nepravilna oblika baze



nepravilna oblika baze



nepravilna oblika baze



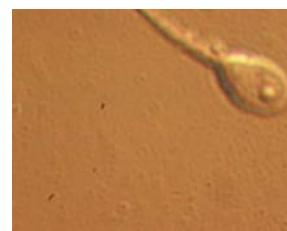
amorfna oblika glava



amorfna oblika glava



izboklina jedrne mase



izboklina jedrne mase



hruškasta glava

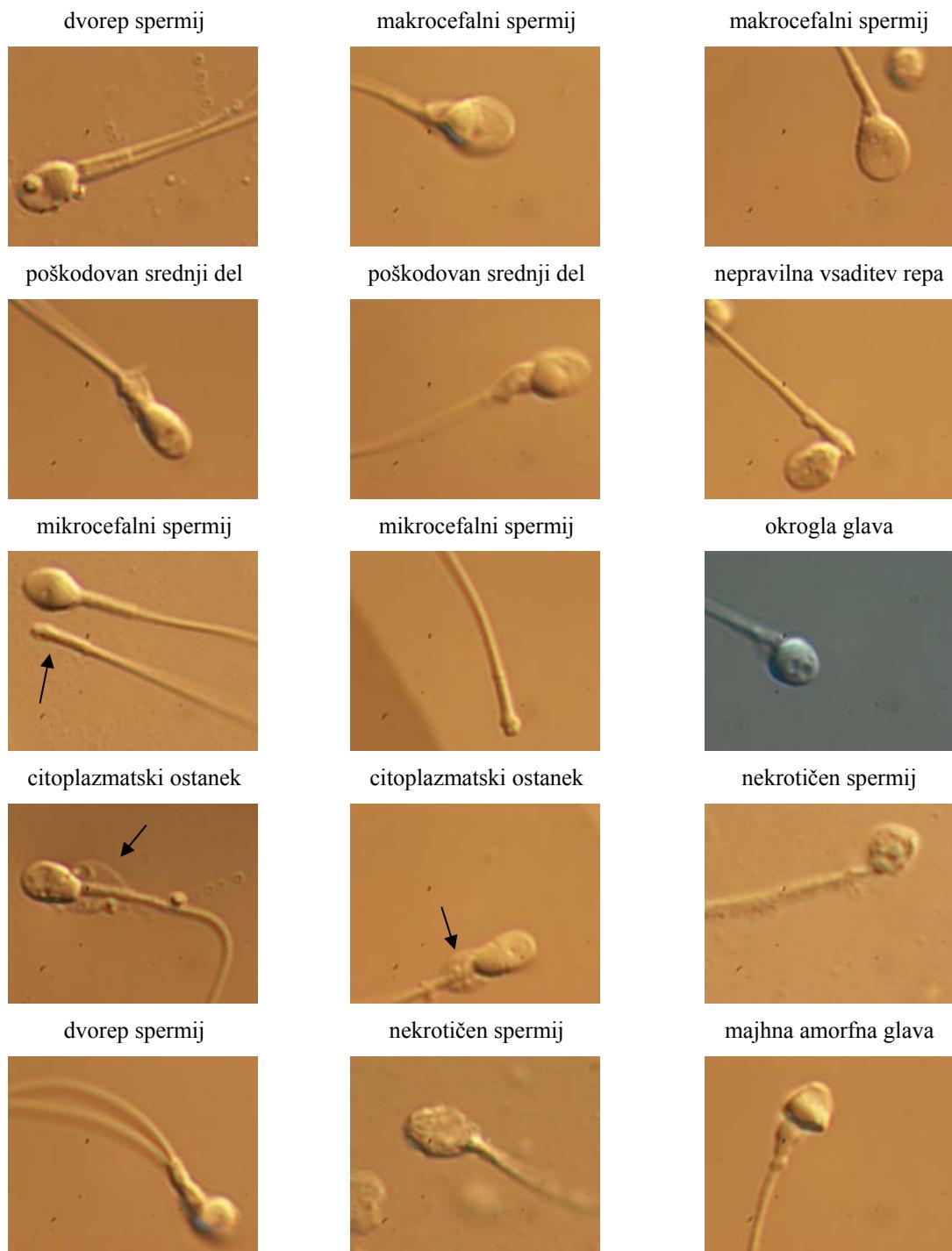


podaljšana glava



Se nadaljuje.

Nadaljevanje.



### Močno deformirani spermiji

(najbolj skrajne oblike spermijev, na katere smo naleteli tekom selekcije)

