

Veljko Vlasisavljevič<sup>1</sup>, Borut Kovačič<sup>2</sup>

# Vbrizganje semenčice v citoplazmo človeške jajčne celice

*Intracytoplasmic Sperm Injection into a Human Oocyte*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** intracitoplazmatsko vbrizganje spermijev, neplodnost moška, otrok razvoj, genetsko svetovanje

Postopek oploditve jajčne celice z injiciranjem semenčice v njeno citoplazmo je v osnovi spremenil možnost zdravljenja moške neplodnosti. Opisana metoda mikrokirurške oploditve jajčeca omogoča očetovstvo tudi v primerih, ko so na voljo samo posamezne semenčice, ne glede na njihov izvor (ejakulirane ali izolirane iz tkiva moda). Partnerja lahko pričakujeta uspešno zdravljenje (zanositev) v enem poskusu oploditve z vbrizganjem semenčice v citoplazmo jajčne celice v 20 do 35 %. V prispevku so predstavljene indikacije za rabo ICSI v klinični praksi, izsledki zdravljenja z ICSI ter ugotovitve o razvoju otrok, spočetih s to tehniko. Predstavljene so tudi možne nevarnosti uporabe omenjene metode ter ugotovitve, ki smo jih ob genetskem svetovanju dolžni predstaviti bolnikom.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** sperm injections intracytoplasmic, infertility male, child development, genetic counseling

Treatment of male infertility using the technique of intracytoplasmic sperm injection brought about a basic change in the possibilities of male infertility treatment. The described method of microsurgical egg fertilization makes paternity possible even in cases when only a single sperm or individual sperms are available, regardless of their origin (ejaculated or isolated from testicular tissue). The partners can expect successful treatment (pregnancy) in one ICSI attempt in 20–35%. The paper presents the indications for intracytoplasmic sperm injection application in clinical practice, the results of treatment with ICSI and findings regarding the development of children conceived with this technique. Presented are the potential risks of using the mentioned method and the findings with which we are obliged to acquaint the patients during genetic counselling.

---

<sup>1</sup> Prof. dr. Veljko Vlasisavljevič, dr. med., Služba za ginekologijo in perinatologijo, Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2101 Maribor.

<sup>2</sup> Dr. Borut Kovačič, univ. dipl. biol., Služba za ginekologijo in perinatologijo, Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2101 Maribor.

## UVOD

Zunajtelesna oploditev (IVF ali angl. *in vitro fertilization*) je bila ob prvem kliničnem uspehu 1978. leta metoda, ki je bila namenjena izključno zdravljenju ženske neplodnosti (1). Že v drugi polovici 80. let so to metodo uporabljali tudi za zdravljenje lažjih oblik moške neplodnosti, npr. v primerih, kjer je bilo zmanjšano število semenčic v semenskem izlivu (oligozoospermija) (2). Korist od IVF so lahko pričakovali le tisti pari, ki so jim z laboratorijsko obdelavo semenskega izliva izolirali zadostno število oziroma koncentracijo progresivno gibljivih semenčic, pri kateri so lahko pričakovali oploditev v pogojih *in vitro*. Uspešnost postopka ni bila odvisna samo od števila, ampak tudi od funkcionalnih lastnosti semenčic, zato je bil postopek pri težjih oblikah oligozoospermije pogosto neuspešen.

Da bi izboljšali rezultate oploditve jajčne celice tudi v primerih težjih oblik oligozoospermije, so semenčicam poskušali olajšati vstop v jajčno celico. To so dosegli z mikrokirurškimi posegi na jajčni celici. Za ta poseg so uporabili mikroskop, opremljen z mikromanipulatorji (ročicami) in instrumentarijem (mikropipete) (slika 1). Mikromanipulatorji so služili za kontrolirano in natančno uvaja-

nje mikropipete v celico. Zato se je tovrstne tehnike oploditve oprijelo tudi ime mikromanipulacija. Pravilneje bi jo sicer opredelili kot postopek mikrokirurške oploditve (fertilizacije) jajčne celice.

Najenostavnejši med mikrokirurškimi posegi na jajčni celici je vrtanje odprtine v zoni pelucidi jajčne celice. To metodo poznamo v strokovni literaturi kot PZD (angl. *partial zone drilling*). Semenčice, ki plavajo v gojišču skupaj z jajčno celico, naj bi tako lažje vstopile skozi zono pelucido, v jajčno celico.

Bolj invazivna oblika zagotavljanja vstopa semenčic v jajcece je bila SUZI (angl. *subzonal injection*). V tej metodi so vnesli eno ali več (3 do 5) semenčic v perivitelinski prostor jajčne celice pod zono pelucido.

Metoda, ki je končno uveljavila postopek mikrokirurških oploditev jajčeca, je bila ICSI (angl. *intracytoplasmic sperm injection*). Gre za postopek, ko vbrizgamo eno semenčico neposredno v citoplazmo jajčne celice. Čeprav so vse tri tehnike pričeli klinično uporabljati približno v istem času, SUZI 1987. leta (3) ter PZD in ICSI 1988. leta (4, 5), se je 1992. leta s prispevkom Palermo in sodelavcev (6) o prvem kliničnem uspehu po ICSI pričelo novo obdobje v zdravljenju moške neplodno-



Slika 1. Invertni mikroskop z mikromanipulatorji, na katerem se izvaja postopek vbrizganja semenčice v citoplazmo jajčne celice.

sti. Metoda ICSI je v osnovi spremenila tudi mnoge androloške principe v diagnostiki in zdravljenju moške neplodnosti ter omogočila očetovstvo številnim moškim, ki do tedaj niso imeli možnosti za ustrezno pomoč.

## POSTOPEK VBRIZGANJA SEMENČICE V CITOPLAZMO JAJČNE CELICE

### Priprava jajčec za vbrizganje

Vsebino preovulatornih foliklov aspiriramo 36 ur po aplikaciji humanega horionskega gonadotropina (hCG). Aspiriramo lahko en folikel, ki je dozorel v naravnem ciklusu, ali več foliklov, katerih razvoj smo spodbujali z dnevno aplikacijo folikle stimulirajočega hormona (FSH). V aspiratu folikla poiščemo jajčno celico in jo preneseemo v gojišče.

Jajčno celico izluščimo iz ovoja granuloznih celic kumulusa zaradi boljše ocene njene zrelosti in zaradi tehnične izvedbe ICSI. To opravimo z večkratnim pipetiranjem kompleksa jajčne celice in kumulusa v gojišču z encimom hialuronidazo. Postopek čiščenja v hialuronidazi ne sme trajati več kot 15 sekund zaradi njenega toksičnega učinka. Nato predstavimo celice v čisto gojišče. Za ICSI izberemo samo zrele jajčne celice. To so tiste, ki so izločile prvo polarno telo.

### Priprava semenčic pred vbrizganjem v citoplazmo jajčne celice

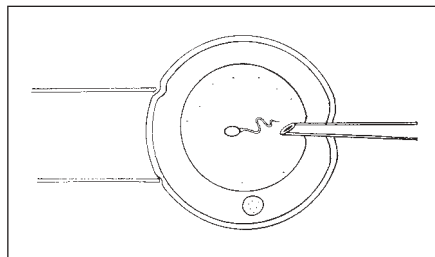
Bolniki pri katerih opravljamo ICSI imajo v semenskem izlivu večinoma zelo majhno koncentracijo semenčic. Mnogi med njimi imajo na osnovi prejšnjih analiz nativnega semenskega izliva potrjeno azoospermijo. Pri mnogih med njimi lahko po centrifugiranju celotnega semenskega izliva najdemo v usedlini le nekaj semenčic (kriptoospermija), kar zadostuje za ICSI.

Pri tistih, kjer je semenčic nekaj več, vendar premalo za IVF, uporabimo laboratorijske postopke koncentriranja in čiščenja semenčic. To dosežemo s centrifugiranjem semena v zelo viskoznih tekočinah. Po istem postopku obdelamo tudi semenčice iz bioptičnega materiala testisa.

Semenčico, primerno za vbrizganje izberemo na osnovi morfoloških meril. Dobra gibljivost semenčice v postopku ICSI ni potrebna. Kot znak vitalnosti celice zadostujejo le trzljaji repka. V postopku lahko uporabimo tudi negibljive celice s predpostavko, da so med njimi tudi vitalne celice.

### Vbrizganje semenčice v citoplazmo jajčne celice

Vbrizganje izvedimo pod mikroskopom pri 200-kratni povečavi. Spolne celice plavajo v kapljicah gojišča, ki jih prekriva parafinsko olje. Jajčece prisesamo na drzhalno pipeto z gladkimi robovi, premera 20  $\mu\text{m}$ . Z drugo, tanjšo pipeto (8  $\mu\text{m}$ ) izberemo po eno semenčico. Pred injiciranjem preneseemo vsako semenčico v polivinilpirolidon – snov, v kateri se semenčice očistijo in upočasnijo gibanje. Upočasnjenim lahko natančneje ocenimo morfologijo in jih lažje povlečemo v brizgalno pipeto. Semenčico predhodno naredimo negibno tako, da ji prelomimo rep. Na ta način ji poškodujemo membrano, kar poškodba membrane ima pomembno vlogo pri kasnejši aktivaciji jajčne celice. Pipeto s semenčico približamo zoni pelucidi jajčeca na mestu, ki je nasproti insercije drzhalne pipete. Nato jo potisnemo skozi zono pelucido in skozi citoplazmo skoraj do nasprotnega roba celice. Plazemska membrana jajčne celice je zelo elastična in jo z vbrizgom pipete redko preluknjamo. Skoraj vedno se usloči v notranjost jajčne celice tako globoko, kolikor smo vanjo potisnili pipeto. Prehod pipete skozi membrano zagotovimo šele z dodatno aspiracijo citoplazme. V citoplazmi semenčico odložimo in pipeto izvlečemo (slika 2). Celico preneseemo v čisto gojišče. Nekaj minut po posegu se zapre lijak, ki smo ga naredili pri uvajanju



Slika 2. Jajčna celica med postopkom vbrizganja semenčice.

mikropipete. Pri vbrizgu propade manj kot 5 % jajčec. Že osem ur po posegu lahko opazimo nastala pronukleusa, kar je znak uspešne oploditve.

## **INDIKACIJE ZA OPLODITEV JAJČNE CELICE Z VBRIZGANJEM SEMENČIC V NJENO CITOPLAZMO**

Z mehničnim vnosom semenčice v citoplazmo jajčeca prisilno združimo spolne celice, kar se v naravnih pogojih nikoli ne bi zgodilo. Pri tem število semenčic, njihova gibljivost in oblika (morfoloģija) ter zrelost ne vplivajo na uspešnost oploditve. Le-ta je enaka, če uporabimo semenčice iz semenskega izliva (ejakulata), nadmodka (epididimisa) ali iz tkiva moda.

### **Indikacije za ICSI z zrelo semenčico iz semenskega izliva (ejakulata)**

- oligoastenoteratozoospermija težje stopnje z manj kot 500.000 gibljivih, morfološko normalnih semenčic v semenskem izlivu;
- kriptozoospermija (posamezne semenčice v semenskem izlivu);
- globozoospermija (prevladujoče okrogloglave semenčice brez akrosoma);
- protitelesa proti semenčicam v visokem titru;
- ejakulatorne motnje (retrogradna ejakulacija, izostanek ejakulacije);
- odmrznjen vzorec semena z majhnim številom preživelih semenčic;
- ponavljajoči se izostanek oploditve po IVF;
- predimplantacijska genetska diagnostika, ki jo opravimo na zarodku z manj kot 8 blastomer.

### **Indikacije za ICSI s semenom, pridobljenim z mikrokirurško ali perkutano aspiracijo semenčic iz nadmodka (MESA, PESA)**

- obstrukcije ejakulatornih vodov,
- neuspele vasoepididimostomije in vasostomije,
- Youngov sindrom (obstrukcija nadmodka ob prisotnosti bronhektazij in sinusitisa),
- prirojena obojestranska aplazija vodov.

Semenčice lahko poiščemo tudi v tkivu testisa, ki ga odvezamo z odprto, kirurško biopsijo (TESE) ali z aspiracijsko igelno biopsijo (TESA).

### **Indikacije za ICSI s semenčicami, izoliranimi iz bioptičnega materiala moda**

- vse indikacije za MESA, PESA;
- obstruktivna azoospermija (v ejakulatu ni semenčic);
- neobstruktivna azoospermija (zastoj v dozorevanju, nepopolni *Sartoli cell-only sindrom* ter mozaični *Klinefelterjev sindrom*);
- tkivo moda, shranjeno (zamrznjeno) v spermalni banki pred onkološkim zdravljenjem.

Azoospermija je vsekakor najbolj pomembna indikacija za ICSI. Moški z azoospermijo v obdobju pred ICSI niso imeli možnosti postati očetje, razen v nekaterih primerih obstruktivne azoospermije po operativni korekciji prehodnosti izvodil. V približno polovici primerov lahko azoospermijo opredelimo kot obstruktivno. V drugi polovici primerov pa je azoospermija neobstruktivna in je rezultat pomanjkljive spermatogeneze. Ne glede na bazalne vrednosti FSH v serumu, volumen mod ali anamnestične podatke lahko v bioptičnem materialu tkiva moda tudi v teh primerih včasih najdemo semenčice. Na žalost lahko pričakuje uspeh samo polovica teh bolnikov in še to pogosto po večkratnem vzorčenju tkiva moda. Enako uspešna kot odprta biopsija med kirurško eksploracijo moda ali nadmodka je manj invazivna perkutana aspiracijska igelna biopsija moda ali nadmodka (PESA). V primeru, da v bioptičnem materialu moda moških z neobstruktivno azoospermijo ne najdemo semenčic, ki so morfološko enake tistim iz ejakulata, se lahko uporabijo kar spermatide. Le-te imajo haploidno število kromosomov (7). Za injiciranje uporabljajo bodisi okrogle (8, 9), bodisi podaljšane spermatide (*ROSI – round sperm-tide sperm injection*) (8–11). Poročajo tudi o uspešnih zanositvah po ICSI s spermatidami, ki so jih predhodno zamrznili in o nosečnostih po injiciranju jajčnih celic samo z jedri spermatid (*ROSNI*) (12). Kljub temu da je v literaturi opisanih nekaj prime-

rov zanositev po ROSI oz. ROSNI, je treba imeti omenjeni metodi, zaradi izjemno slabe uspešnosti, za eksperimentalni.

## DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA USPEŠNOST ICSI

Tako kot pri IVF tudi pri ICSI podobna opremljenost laboratorijev z napravami in poznavanje tehnologije postopka ne zadoščata za enako uspešnost programa v različnih centrih. Na rezultate centrov lahko vpliva še selekcija bolnikov, predvsem pa izkušnost in izurjenost skupine, ki se ukvarja z omenjeno metodo zdravljenja. Enako velja za podatke, ki jih najdemo v državnih registrih. Le-ti so povprečne vrednosti rezultatov iz več centrov posamezne države. Po podatkih za leto 1997 se uspešnost zdravljenja z ICSI (odstotek nosečih na en ICSI-cikel) giblje med 10 in 35%. Vrednost 10% uspešnih poskusov je tudi meja minimalnih standardov, ki jo mora center doseči, da lahko opravlja postopek zunajtelesne oploditve (13). V Sloveniji je uspešnost zdravljenja z ICSI blizu zgornji meji (14). Nekateri od pogojev, ki pomembno vplivajo na uspešnost ICSI programa, so starost bolnice, število in kakovost jajčnih celic, značilnost semenčic, laboratorijski pogoji in prenos zarodkov.

### Starost bolnice

Jajčeca, ki dozoriijo ob ovulaciji, so stara toliko kot sama bolnica. To je razlog, da se s starostjo bolnice zmanjšuje tudi oploditvena sposobnost jajčec. Pripravljenost maternice za vgnezditev zarodka pa se s starostjo ne spreminja. Bolnica lahko pričakuje zanositev po ICSI ciklusu v 35%, če je mlajša od 35 let, v 30% v starosti med 35. in 40. letom ter le v 10% v starosti med 40. in 45. letom. Odstotek s porodom zaključenih zanositev je po 40. letu izjemno nizek (15, 16). V 45. letu je uspešnost katerekoli od tehnik asistiranre reprodukcije izjemno slaba, saj je odstotek zanositev nižji od 2% (17).

### Število in kakovost jajčnih celic

Število in kakovost jajčec sta odvisni poleg starosti bolnice tudi od izbranega protokola za

spodbujanja razvoja foliklov. Danes je splošno uveljavljen način spodbujanja ovulacije s kombinacijo gonadotropinov (humani FSH urinarnega izvora ali pridobljen z rekombinantno tehnologijo) in agonistov gonadotropine sproščajočega hormona (buserelin, triptorelin, nafarelin, goserelin). S temi zdravili zagotovimo najboljše pogoje za pridobivanje večjega števila jajčec, primernih za postopek zunajtelesne oploditve. Razen na kakovost pridobljenih jajčnih celic vpliva izbrani protokol spodbujanja ovulacije tudi na receptivnost endometrija za implantacijo zarodkov.

Z aspiracijo večjega števila foliklov, ki jo opravimo 36 ur po aplikaciji injekcije hCG (hormon, ki je biološki ekvivalent luteinizirajočemu hormonu), dobimo kohorto različno zrelih in kakovostnih jajčec. Zrelost jajčeca lahko ocenimo po mehničnem in kemičnem odstranjevanju kumulusnih celic granulose, ki obdajajo jajčece. Povprečno je 80 do 90% jajčec v stadiju metafaze II (MII), 5 do 10% v metafazi I (MI) in 5 do 10% v profazi I, ko je še vidno jedro celice (stadij germinalnega vezikla ali GV).

V naslednjih dveh do šestih urah lahko injiciramo le zrele jajčne celice v metafazi II (MII). Nezrele celice v MI morajo dozoreti in jih lahko injiciramo šele po šestih do osmih urah, če dosežejo MII. Celice v GV-stadiju potrebujejo za dozorevanje do MII stadija 24 ur le v primeru, da dozoriijo do stadija MII. Injiciranje jajčec, ki so dozorela v *in vitro* pogojih, lahko omogoči razvoj morfološko normalnih zarodkov s sposobnostjo vgnezditve.

### Značilnosti semenčic

V ICSI-postopku je pomembno, da najdemo v semenskem izlivu vsaj toliko semenčic, kolikor je jajčnih celic, ki jih želimo oploditi. Na rezultate ICSI ne vpliva koncentracija semenčic, njihova gibljivost in morfologija oziroma prisotnost protiteles proti semenčicam (18).

Vsebujejo pa semenčice posebno komponento citosola, ki povzroči aktivacijo jajčeca (19, 20). Pri globozoospermiji, kjer v semenskem izlivu prevladujejo okrogloglave semenčice brez akrosoma, je pogosta tudi odsotnost omenjene frakcije citosola. Zato v teh primerih tudi z ICSI težko dosežemo oploditev jajčne celice.

ICSI-postopek je otežen tudi v primeru, ko so v izlivu le negibljive semenčice. Pričakovani odstotek oplojenih jajčec po uporabi negibljivih semenčic v ICSI-postopku je okoli 10 % (21), saj med injiciranjem ne moremo zanesljivo ločiti živih semenčic od mrtvih. Bolj uspešen (45 % oploditev) je ICSI z negibljivimi semenčicami iz bioptičnega vzorca tkiva moda. V primerih, ko uporabimo gibljive semenčice iz tkiva moda, je pričakovana stopnja oplojenosti celic 65 %.

### Laboratorijski pogoji

Uspešnost ICSI je ob kakovostnih pogojih *in vitro* odvisna še od izkušenj in izurjenosti skupine, ki postopek opravlja. Analiza rezultatov iz več različnih centrov, ki se ukvarjajo z ICSI, kaže, da se le-ti s številom opravljenih ICSI-ciklov izboljšujejo (27).

V centrih z dolgoletnimi izkušnjami je delež celic, ki med izvajanjem postopka propadejo, nizek, saj ne presega 5 %. Razen lezije celice so poznane še druge poškodbe, ki lahko nastanejo pri obdelavi jajčne celice med ICSI. Te so lahko po izvoru kemične ali mehanične. Dolgotrajno izpostavljanje jajčec hialuronidazi povzroči umetno aktivacijo. Polivinipirolidon, ki zmanjša gibljivost semenčic, je potencialno toksičen in zavira oploditev. Zato je pomembno, da se ga v celico vnese čim manj. Med mehaničnimi poškodbami so najpogostejše poškodbe citoskeleta, delitvenega vretena in membran. Pomembna je orientacija jajčne celice med injiciranjem. Jajčece obrnemo tako, da je polarno telo pri 6. ali 12. uri. Celico predremo z mikropipeto pri 3. uri, kjer semenčico tudi injiciramo. Na ta način se poskušamo izogniti poškodbam delitvenega vretena (6).

8 do 16 ur po injiciranju jajčne celice lahko ugotovimo uspešnost oploditve. Običajno je ta prisotna pri 60 do 80 % injiciranih jajčnih celic. Neoplojenost vseh jajčnih celic po ICSI je redka, če imamo na voljo vsaj tri jajčeca za injiciranje (manj kot 5 %). V primerih normalne oploditve se jajčna celica prvič deli povprečno 48 ur po injiciranju semenčice. Dinamiko delitev (hitrost oz. pogostnost) in morfološke značilnosti zarodkov opazujemo 48 in 72 ur po ICSI. V kompleksu celic, ki tvorijo zarodek, ocenjujemo število in obliko blastomer, prisotnost brezjedrnih (citoplaz-

matskih) drobcev. Po teh značilnostih poskušamo oceniti njihovo sposobnost za implantacijo po prenosu v maternico. Za prenos zarodkov izberemo morfološko najbolj primerne. Preostale zarodke lahko zamrznemo in shranimo v tekočem dušiku na  $-196^{\circ}\text{C}$ , za morebiten prenos v enem od naslednjih ciklov če ne pride do zanositve s svežimi zarodki. Zarodke lahko hranimo pet let.

### Prenos zarodkov

Prenos zarodkov je pomemben del samega postopka, saj je končni rezultat postopka odvisen tudi od same tehnike prenosa zarodkov v maternico. Prenos zarodkov mora biti izveden brez poškodb in tehnično brezhibno. Navajajo, da je med posameznimi člani iste skupine terapevtov različna uspešnost, ki se meri z odstotkom zanositev na prenos zarodka. Glede na starost bolnice se odločamo za prenos dveh oziroma treh zarodkov v maternico.

### REZULTATI ICSI

Uspešnost zanositev po ICSI upada s starostjo bolnice (22). Rezultati oploditve jajčec s tehniko ICSI so podobni, ne glede na izvor semenčic (ejakulirane, aspirirane iz nadmodka ali moda). Verjetnost, da se celice oplodijo po ICSI, je med 60 in 80 %. Stopnja oplojenosti celic in stopnja zanositve je višja pri obstruktivni kot pri neobstruktivni azoospermiji (23, 24). Vzrok temu so lahko genetske nepravilnosti ali genetsko določena ovira za reprodukcijo, ki bi naj bile pogostejše pri neobstruktivni azoospermiji (25, 26).

Izvor semenčic, uporabljenih za ICSI, ne vpliva niti na izid nosečnosti. Pričakuje se, da 67 do 73 % bolnic, ki zanosijo po ICSI, tudi donosi in rodi (27).

Med nosečimi lahko pričakujemo večplodno nosečnost v 29 do 35 % (26). Zunajmaternična zanositev je po ICSI manj pogosta (1,2 do 1,7 %), kot po zanositvi po IVF (3,6 do 4,3 %). Razlog za to so verjetno bolj pogosto zdravi jajcevodi pri bolnicah v ICSI-postopku, kot pri tistih, ki se zdravijo z IVF.

Večplodna nosečnost je nezaželen zaplet vseh postopkov zunajtelesne oploditve. Pri ICSI je enako pogosta kot pri IVF in je odvisna od števila prenesenih zarodkov. Po



podatkih največjega evropskega centra v Bruslju je odstotek dvoplodnih nosečnosti po ICSI 26 % in triplodnih nosečnosti 3 % (27).

## **SPREMLJANJE OTROK, SPOČETIH Z ICSI**

Največja težava otrok, rojenih po ICSI so, podobno kot po IVF, prezgodnji porod in nizka porodna teža, kar je v povezavi z višjim odstotkom večplodnih nosečnosti.

Zaradi dejstva, da prihaja z ICSI do srečanja spolnih celic brez naravnega izbora, so razvoju otrok, rojenih po ICSI, v prvih letih uporabe metode intenzivno sledili. Ugotovili so, da je 2,3 % otrok imelo neko prirojeno funkcionalno napako ali kirurško popravljivo malformacijo. Pogostnost pojavljanja teh težjih malformacij ni bila statistično značilno pogostejša kot pri otrocih rojenih po naravni konceptiji (28).

Pri analizi zarodkovih kariotipov so na kromosomih otrok, spočetih z ICSI, našli značilno več novonastalih aberacij (nepravilnosti števila in/ali strukture) spolnih kromosomov (0,83 %), kot pri preostali neonatalni populaciji (0,19–0,23 %) (28). Analiza novonastalih aberacij avtosomnih kromosomov je pokazala povečano pojavljanje le-teh v primerjavi s preostalo neonatalno populacijo (0,07 %). Pojavnost novonastalih prirojenih kromosomskih aberacij avtosomnih kromosoma pa je bila statistično značilno višja (0,36 %) zaradi višje povprečne starosti mater, ki so zanosile po ICSI, morda pa tudi zaradi uporabe same metode. Niso našli povezave med tveganjem za nastanek kromosomskih aberacij pri zarodku in stopnjo okvare spermiogeneze (28).

## **MOŽNE NEVARNOSTI ICSI**

Pri ICSI ni naravnega izbora spolnih celic. Semenčice lahko v primerih težke oligozoospermije vsebujejo skrito genetsko napako (29). Med neplodnimi moškimi je višji odstotek kromosomskih nepravilnosti (25). ICSI z aneuploidnimi semenčicami imajo lahko za posledico rojstvo otrok z aneuploidijami. Le-te so pogostejše pri spolnih kromosomih (30). Z uporabo semenčice iz moda moškega, ki ima prirojeno obojestransko apla-

zijo semenovodov, se v primerjavi s splošno populacijo poveča verjetnost, da bo spočet otrok imel cistično fibrozo (31, 32).

Z ICSI je povečana možnost okvar meiotičnega delitvenega vretena po injiciranju semenčice v njegovo bližino. Možne so tudi okvare biokemičnih mehanizmov, ki nastanejo zaradi vnosa neželenih snovi (medij, PVP, parafinsko olje). V jajčne celice se med injiciranjem lahko nehote prenese še citoplazmatske strukture drugih celic (npr. granuloze) in mitohondrije semenčice, ki sicer ne bi mogli vstopiti v jajčno celico. Z njimi injiciramo v jajčno celico tudi nove nezaželene dele DNA.

## **GENETSKO SVETOVANJE**

Dolžnost terapevta je, da seznanijo bolnice tudi z morebitnimi negativnimi posledicami pred uporabo te, zelo invazivne metode. Pomembne ugotovitve na osnovi do sedaj zbranih podatkov in dosedanjih izkušenj z uporabo ICSI v zdravljenju najtežjih oblik moške neplodnosti so:

- pri zdravljenju z ICSI ni povečanega tveganja za nastanek prirojenih malformacij;
- povečano je tveganje za dedovanje kromosomskih aberacij;
- povečano je tveganje za nastanek novonastalih aberacij, predvsem spolnih kromosomov;
- mogoč je prenos neplodnosti na moške potomce.

## **RAZVOJ OTROK**

Otroke spočete z ICSI metodo so prospektivno sledili nekaj let v številnih okoljih (33). Ugotovili so, da so njihove zdravstvene težave (hospitalizacije, obiski pri zdravniku, glavne zdravstvene težave) ter razvoj (rast, teža in obseg glavnice) podobni kot pri populaciji naravno spočetih otrok. Raziskovali so tudi kakovost starševstva v družinah s tako spočetimi otroci. Ugotovili so, da so matere, očetje in otroci v takšnih družinah imeli tesnejši medsebojni stik kakor v družinah z naravno spočetimi otroci. Pri otrocih niso opazili razlik v nagnjenosti k psihološkim motnjam in ne v njihovem dožemanju kakovosti medsebojnih odnosov v družini (33).

**LITERATURA**

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.
2. Yovich JL, Stanger JD. The limitations of in vitro fertilization from males with severe oligospermia and abnormal sperm morphology. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 1984; 1: 172-9.
3. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pro-nuclear formation by micromanipulation of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 1988; 49: 835-42.
4. Cohen J, Malter M, Fehilly C, Wright G, Elsnor C, Kort H, Massey J. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988; 2: 162.
5. Lewis-King A, Trounson A, Sathananathan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of single spermatozoon under zona pellucida. *Fertil Steril* 1987; 48: 637-42.
6. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
7. Edwards RG, Tarin JJ, Dean N, Hirsh A, Tan SL. Are spermatid injections into human oocytes now mandatory? *Hum Reprod* 1994; 9: 2217-9.
8. Fishel S, Green S, Bishop M, Thornton S, Hunter A, Flemings, et al. Pregnancy after intracytoplasmic injections of spermatid. *Lancet* 1995; 345: 1641-2.
9. Tesarik J, Mandoza C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum Reprod* 1996; 11: 772-9.
10. Antinori S, Versaci C, Dani G, Antinori M, Pozza D, Selman HA. Fertilization with human testicular spermatis: four successful pregnancies. *Hum Reprod* 1997; 12: 286-91.
11. Araki Y, Motoyama M, Yoshida A, Kim SJ, Sung H, Araki S. Intracytoplasmic injection with late spermatis: successful procedure in achieving childbirth for couples in which the male partner suffers from azoospermia due to deficient spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997; 67: 550-61.
12. Antinori S, Versaci C, Dani G, Antinori M, Selman HA. Successful fertilization and pregnancy after injection of frozen-thawed round spermatis into human oocyte. *Hum Reprod* 1997b; 12: 554-6.
13. The American Society for Reproductive Medicine. Revised minimum standards for in vitro fertilization, gamete intrafallopian transfer and related procedures. *Fertil Steril* 1998; 70 Supl 2: 1-5.
14. Vlaisavljević V, Kovačić B, Gavrić Lovrec V, Reljić M. Simplification of the clinical phase of IVF and ICSI treatment in programmed cycles. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 69: 135-42.
15. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and the report of two new studies. *Fertil Steril* 1990; 54: 978-83.
16. Lansac J. Is delayed parenting a good thing? *Hum Reprod* 1995; 10: 1033-6.
17. Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garissi GJ, Guzman I, Sander B, et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age related decline in female fertility. *Lancet* 1991; 337: 1375-7.
18. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995; 10: 1123-9.
19. Fishel S, Lisi F, Rimaldi L, Green S, Hunter A, Dowel K, et al. Systemic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in the human. *Hum Reprod* 1995; 10: 497-500.
20. Palermo GD, Schlegl PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod* 1996; 10: 1023-9.
21. Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Steirteghem A. Using ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; 63: 808-15.
22. FIVNAT. In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rate. *Hum Reprod* 1990; 5: 56-9.
23. Kahraman S, Ozgur S, Alatas C, Alsoy S, Balaban B, Evrenkaya T, et al. High implantation and pregnancy rates with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 673-6.
24. Mansour RT, Kamal A, Fahmy I, Tawab N, Serour GI, Abloulghar MA. Intracytoplasmic sperm injection in obstructive and nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 1974-9.
25. Chandley AC. The genetic basis of male infertility. *Reprod Med Rev* 1995; 4: 1-8.
26. Vogt PH. Genetic aspects of human infertility. *Int J Androl* 1995; 18: 3-6.
27. Tarlatzis B. Report of the activities of the ESHRE task force on the intracytoplasmic sperm injection. In: Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers, eds. *Genetics and Assisted Human Conception*. Oxford: Oxford University Press; 1996. pp. 160-176.
28. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Assche EV, Devroey P, Steirteghem A, et al. A follow up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1: 196-207.



29. Cummins JM, Jequier AM. Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. *Hum Reprod* 1994; 9: 1214-9.
30. Persson JW, Peters GB, Saunders DM. Genetic consequences of ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11: 921-32.
31. Chillon M, Casals T, Menciaer B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332: 1475-80.
32. Silber S, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, et al. The use of epididimal and testicular sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 2031-43.
33. Terlatzis B, Grimbizis G. Pregnancy and child outcome after assisted reproduction techniques. *Hum Reprod* 1999; 14 (Suppl. 1): 231-42.

Prispelo 10. 8. 2000