

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

# Oplopitev in nepravilnosti oploditve po vnosu semenčice v jajčno celico pri človeku

*Fertilization and Fertilization Anomalies in Humans after Sperm Injection into the Oocyte*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** oploditev *in vitro*, intracitoplazmatsko vbrizganje spermijev, oociti, spermiji-jajčice interakcije

Oplopitev je proces združevanja očetovskih in maternih kromosomov v aktivirani jajčni celici. Najpogostejši vzrok za neoplojenost je nesposobnost semenčic, da bi prodrle v jajčno celico. V takšnih primerih lahko spolne celice spojimo tudi mehansko, združevanje njihovih kromosomov pa prepustimo delovanju ooplazme. Pogoj za združitev kromosomov je skladno razvitje očetovskega in maternega kromatina in nastanek moškega in ženskega pronukleusa. Preoblikovanje kromatina ni vedno usklajeno, kar lahko privede do zastoja oploditve. Tehnika imunofluorescenčne mikroskopije neuspešno oplojenih jajčnih celic nam omogoča sočasno opazovanje kromatina in pripadajočih mikrotubulov, najpomembnejših struktur za dinamiko kromosomov med oploditvijo. Z njo lahko ugotovljamo nepravilnosti v procesu združevanja spolnih celic in nekatere vzroke zanje.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** fertilization *in vitro*, sperm injection intracytoplasmic, oocyte, sperm-ovarium interactions

Fertilization is the process of paternal and maternal chromosomes uniting in the activated oocyte. The most frequent reason for fertilization failure is sperm incapacity to penetrate into the oocyte. In such cases the gametes can be united mechanically, but the fusion of their chromosomes is resigned to the action of the ooplasm. The condition required for uniting is synchronous decondensation of paternal and maternal chromatin and formation of a male and female pronucleus. Chromatin transformation is not always coordinated, which may lead to fertilization arrest. With the technique of immunofluorescent microscopy of oocytes failing to fertilize, allowing the simultaneous observation of chromatin and pertaining microtubules – the most important structures for chromosome dynamics during fertilization, we can establish anomalies in the process of gamete union and elucidate some of their causes.

---

<sup>1</sup> Dr. Borut Kovačič, univ. dipl. biol., Služba za ginekologijo in perinatologijo, Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

<sup>2</sup> Prof. dr. Veljko Vlajsavljević, dr. med., Služba za ginekologijo in perinatologijo, Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

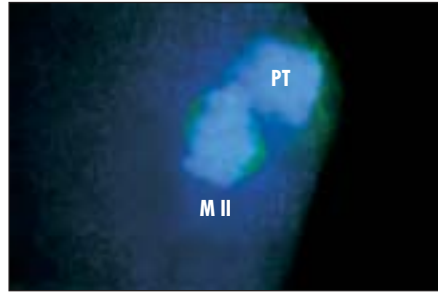
## FIZIOLOGIJA OPLODITVE

Oploditev je proces spajanja starševskih spolnih celic in njihovih kromosomov. Da lahko združevanje teče normalno, se morajo v spolnih celicah zvrstiti določene spremembe. Semenčica se pred vstopom v jajčno celico hiperaktivira, kapacitira in ob stiku z zono pelucido sproži akrosomsko reakcijo. Jajčna celica ji omogoči vstop v citoplazmo, sama se metabolno aktivira, zaključí redukcijsko delitev in izloči drugo polarno telo. Vstop semenčice v jajčno celico je odvisen predvsem od dogajanj na zoni pelucidi – ovojnici jajčne celice. Le-ta je izbirčna, saj normalno veže nase le morfološko idealne semenčice. Prehod skoznjo omogoči samo tisti semenčici, ki prva točno ob stiku z zono sproži akrosomsko reakcijo. Nepravilnosti semenčic in jajčnih celic na tej stopnji oploditve so pogosto lahko vzrok neplodnosti, ki ga lahko s postopkom intracitoplazmatskega injiciranja semenčice v jajčno celico (ICSI) uspešno rešimo in gamete mehansko spojimo. Združevanje njihovih kromosomov pa je nato prepuščeno delovanju citoplazme jajčne celice. Očetovski in materni kromosomi se v jajčni celici razprosterejo, obdajo z jedrno ovojnico, in ko sta pronukleusa drug ob drugem, so ustvarjeni pogoji za združitev starševskih genomov. Tudi napake na katerikoli stopnji tega dela oploditve so lahko usodne za jajčno celico oziroma zigoto, ker preprečijo njun nadaljnji razvoj.

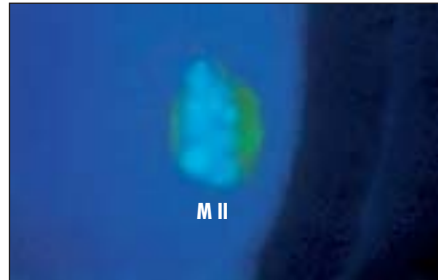
S tehniko imunofluorescenčne mikroskopije neuspešno oplojenih jajčnih celic iz postopkov fertilizacije *in vitro* (IVF) in ICSI, ki omogoča sočasno opazovanje kromatina in pripadajočih mikrotubulov, najpomembnejših struktur za dinamiko kromosomov med oploditvijo, lahko ugotovljamo nepravilnosti v procesu združevanja kromosomov spolnih celic in nekatere vzroke zanje.

### Kromosomi in mikrotubuli jajčne celice ob vstopu semenčice

Preovulatorna jajčna celica (sliki 1 in 2) ima materne kromosome v metafazi II. Le-ti so kondenzirani in razporejeni v ekvatorialni ravnini drugega mejotičnega delitvenega vretena, ki je usmerjeno pravokotno na celični korteks. Semenčica po vstopu aktivira jajčno celico in



Slika 1. Zrela preovulatorna jajčna celica. Materni kromosomi so v metafazi druge redukcijske delitve (M II), razporejeni v ekvatorialni ravnini delitvenega vretena, ki leži v korteksu pod prvim polarnim telesom (PT).



Slika 2. Zrela preovulatorna jajčna celica. Materni kromosomi so v metafazi druge redukcijske delitve (M II), razporejeni v ekvatorialni ravnini delitvenega vretena; prvo polarno telo (PT) je odmaknjeno od delitvenega vretena.

vzpodbudi dokončanje druge redukcijske delitve. Tedaj se izloči ena garnitura kromatid v obliki drugega polarnega telesa. Delitveno vreteno se nato razgradi (1).

### Centrosom semenčice in astralno žarkovje

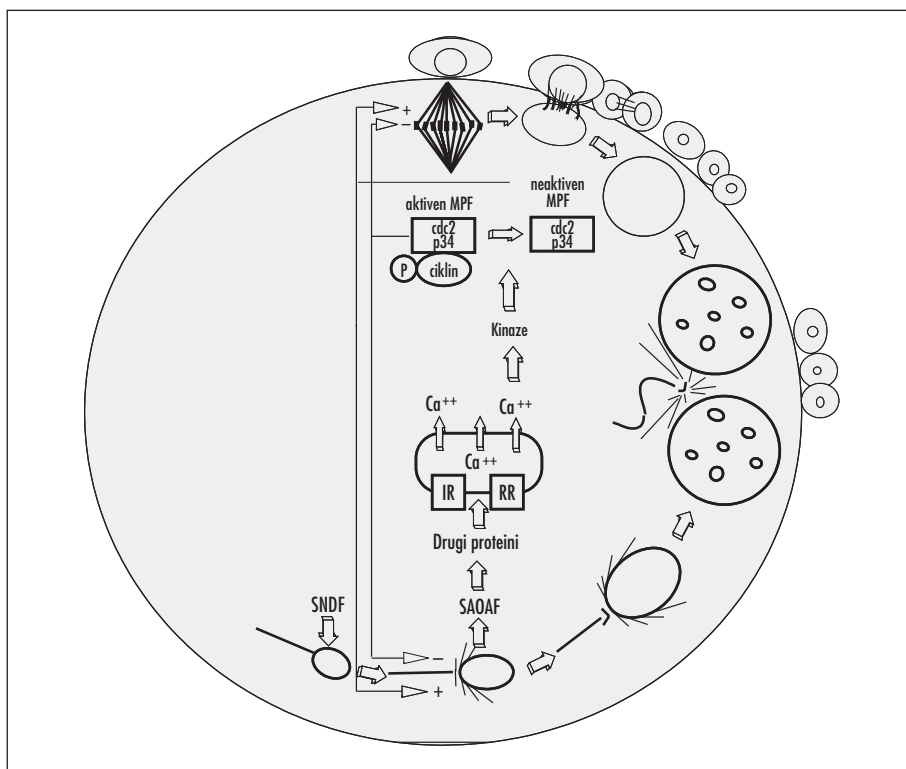
Po vstopu semenčice v citoplazmo jajčne celice se na bazi glavnice pojavi majhna, zvezdi podobna struktura iz mikrotubulov. To je začetek rasti mikrotubulov astralnega žarkovja semenčice, ki izrašča iz očetovskega centrosoma. Le-ta je v semenčici v skrajno reducirani obliki in v jajčno celico vstopi le kot ogrodje, na katerega se začnejo pripenjati molekule iz citoplazme jajčne celice (2). Ugotavljajo, da je ponovno izoblikovanje centrosoma in rast mikrotubulov iz njega odvisno od prisotnosti gradbenih elementov za centrosom in mikrotubule v citoplazmi jajčne celice. Med

njimi prevladuje tubulin gama. Astralno žarkovje, ki izraste iz centrosoma semenčice, ima vlogo pri združevanju pronukleusov (3, 4).

## VKLJUČEVANJE SEMENČICE V CITOPLAZMO JAJČNE CELICE

Kromosomi semenčice so zaščiteni tako, da so histoni – kromosomski proteini – zamenjani s protamini. Pogoj za uspešno vključitev očetovskih kromosomov v jajčno celico je preoblikovanje jedra semenčice z redukcijo protaminskih disulfidnih vezi in nadomesti-

tev histonov. Ko je dovolj vezi reduciranih, postane kromatin semenčice občutljiv na citoplazmatske faktorje jajčne celice in začne se njegovo razvijanje (5). Jedrna membrana semenčice se razgradi in vsebina jedra se razprostre. Jedro semenčice se najpogosteje nahaja pod celičnim korteksom. Z razprostranjem semenčice raste tudi astralno žarkovje in se širi proti neizločenim kromatidam jajčne celice. V naslednji fazi se razprostrta semenčica po zaslugi astralnega žarkovja začne premikati proti središču celice. Kromatide semenčice in jajčne celice se raztegnejo



Slika 3. Shema preoblikovanja kromatina semenčice in maternih kromosomov med procesom oploditve pri človeku ter vloga posameznih citoplazmatskih faktorjev. Semenčica ima ob vstopu v citoplazmo jajčne celice odstranjeno ali vsaj poškodovano membrano. Samo tako lahko na njeno jedro deluje spermijevo jedro dekonenzirajoči faktor (SNDF). Le-ta povzroči nabrekanje glavice semenčice. Zaradi razširjanja jedra se plazma membrana semenčice razpre na več mestih, kar omogoči sprostitve spermijevega oocit aktivirajočega faktorja (SAOAF) v citoplazmo jajčne celice. SAOAF preko drugih proteinov, ki delujejo na inozitol trifosfat receptorje (IR) in rianodin receptorje (RR), povzroči aktivacijo jajčne celice in sprostitve ionov  $Ca^{++}$  iz znotrajceličnih rezerv v citosol. Ioni  $Ca^{++}$  aktivirajo specifične kinaze, ki povzročijo degradacijo ciklina in inaktivirajo mitozo promovirajoči faktor (MPF), ki sestoji iz ciklina in podenote, homologne produktu gena kvasovk *cdc2*. Inaktivacija MPF omogoči nadaljevanje redukcijske delitve jajčne celice, prehod iz metafaze II v anafazo II, izločitev enega seta kromatid v drugo polarno telo in dekonenzacijo maternih kromosomov. Po vstopu semenčice v jajčno celico izrastejo iz baze glavice radialno izhajajoči mikrotubulni astralnega žarkovja. Med nastajanjem pronukleusov se astralno žarkovje še bolj razraste, doseže ženski pronukleus in ga pritegne k moškemu pronukleusu.

in obdajo z jedrno ovojnico, kar je pod svetlobnim mikroskopom vidno kot moški in ženski pronukleus. Pronukleusa sta sprva majhna in vsebujeta več jedrcem podobnih struktur. Kasneje se pronukleusa povečata in pojavi se nekaj večjih jedrc. Ko astralni mikrotubuli semenčice dosežejo ženski pronukleus, se njihova rast ustavi in omeji le na območje okoli pronukleusov. Center astralnega žarkovja je ponavadi nameščen med pronukleusi (1, 4) (slika 3).

### **Učinek različnih citoplazmatskih faktorjev na kromatin**

Moški in ženski pronukleus se kljub enotni citoplazmi jajčne celice razvijata vsak po svoje. Jedro semenčice je ves čas v interfazi. Njeno spreminjanje v jajčni celici poteka le v smeri razprostiranja kromatina in nastajanja pronukleusa. Materni kromosomi, ki so ob oploditvi v metafazni obliki, najprej zaključijo redukcijsko delitev, šele nato se razprostrejo. Usklajeno razprostiranje očetovskih in maternih kromosomov omogočajo tudi specifični citoplazmatski faktorji (slika 3).

### **Mitozo promovirajoči faktor**

Mitozo promovirajoči faktor (MPF – iz angl. *mitosis promoting factor*) je citoplazmatski faktor, prisoten v celicah v času delitve. To je proteinski kompleks, ki deluje kot kinaza, njegov substrat pa so kromosomski proteini in lamin, zato aktivnost MPF v metafazi celičnega cikla povzroča kondenzacijo kromosomov. Ciklične spremembe v aktivnosti MPF ustrezajo spremembam v kondenziranosti kromatina in omogočajo prehode celice iz ene faze celičnega cikla v drugo. Aktivacija MPF omogoči prehod jajčne celice iz profaze v metafazo I; nato sledi inaktivacija MPF in delitev kromosomov. Njegova ponovna aktivacija pa vodi celico v metafazo II. Takrat je MPF tudi najbolj delujoč. Aktivnost citostatskega faktorja preprečuje ponovno inaktivacijo MPF, kar zadržuje jajčno celico v metafazi II. Šele oploditev in dvig koncentracije ionov  $Ca^{++}$  sproži dokončanje redukcijske delitve (8–10).

### **Spermijev oocit aktivirajoči faktor**

Način aktivacije jajčne celice dolgo ni bil znan. Poskusi na živalih so pokazali, da semenčice različnih vrst vsebujejo specifični spermijev

faktor za aktivacijo jajčne celice (SAOAF – iz angl. *sperm associated oocyte activating factor*). Prisotnost enako delujoče snovi so dokazali tudi v človeških semenčicah (11). Eksperimentalne ugotovitve Dozortseva in sodelavcev (12), da jajčna celica sama ni sposobna razgraditi membrane semenčice, ampak je membrano pred injiciranjem treba poškodovati, da se lahko SAOAF sprost, so znatno povečale uspešnost metode ICSI.

### **Spermijevo jedro dekondezirajoči faktor**

Citoplazma jajčne celice mora ob vstopu semenčice vanjo že vsebovati proteine, odgovorne za razprostiranje kromatina in oblikovanje moškega pronukleusa. Te proteine so poimenovali spermijevo jedro dekondezirajoči faktor (SNDF – iz angl. *sperm nucleus decondensing factor*) ali pa moški pronukleus rastoči faktor (MPGF – iz angl. *male pronucleus growth factor*). Ugotavljajo, da se SNDF razvija v času dozorevanja jajčne celice in da signali za njegovo sintezo in delovanje prihajajo iz folikularnih celic (13).

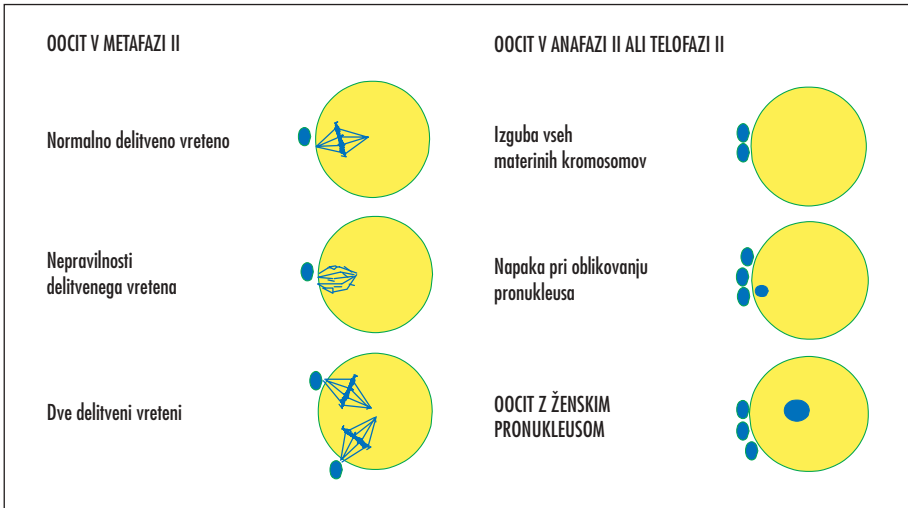
## **NEPRAVILNOSTI OPLODITVE**

Zaradi določenih nepravilnosti se lahko proces oploditve zaustavi v različnih fazah združevanja starševskih kromosomov.

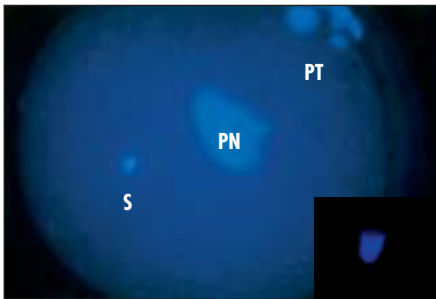
### **Materni kromosomi in mikrotubuli v neoplojenih jajčnih celicah**

V neuspešno oplojenih jajčnih celicah lahko zasledimo naslednje morfološke značilnosti maternih kromosomov in pripadajočih mikrotubulov (slika 4):

- jajčna celica se nahaja v metafazi II, kromosomi so v ekvatorialni ravnini, delitveno vreteno je bipolarno;
- jajčna celica je v metafazi II, mikrotubuli vretena so neorganizirani;
- jajčna celica se nahaja v metafazi II in vsebuje dve mejotični vreteni ter dvojna garnitura kromosomov;
- jajčna celica je v telofazi II in ima vse matrne kromosome v polarnem telesu;
- postmejotično zaustavljena jajčna celica v anafazi II ali telofazi II z neoblikovanim ženskim pronukleusom;
- aktivirana jajčna celica (slika 5) z ženskim pronukleusom.



Slika 4. Konfiguracija materinih kromosomov in mikrotubulov v neoplojenih jajčnih celicah po ICSI.

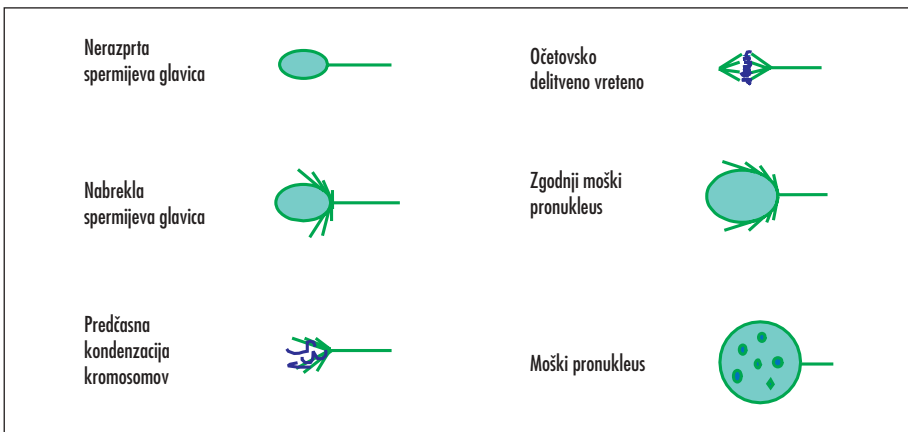


Slika 5. Aktivirana jajčna celica. Materni kromosomi so raztegnjeni in v obliki ženskega pronukleusa (PN). Jedro semenčice (S) se ni uspelo preoblikovati v moški pronukleus.

### Kromosomi in mikrotubuli semenčice v neoplojenih jajčnih celicah

Semenčice se v navidezno neoplojenih jajčnih celicah lahko nahajajo v naslednjih oblikah (slika 6):

- nerazprta spermijeva glavica;
- nabrekla glavica z delno razprostrtim kromatinom in opaznim astralnim žarkovjem;
- predčasno kondenzirani kromosomi semenčice (G1-PCC);



Slika 6. Oblike semenčic v neoplojenih jajčnih celicah po ICSI – postopku, glede na razprtost kromatina in konfiguracijo astralnega žarkovja.

- očetovsko delitveno vreteno in G1-PCC;
- zgodnji moški pronukleus;
- moški pronukleus.

## RAZLOGI ZA NEUSPEŠNO VKLJUČEVANJE SEMENČICE V JAJČNO CELICO

Pri iskanju razlogov za neoplojenost posameznih jajčnih celic je treba obravnavati morfološke značilnosti maternih in očetovskih kromosomov in mikrotubulov skupaj, ker eni drugim pogojujejo nadaljnji razvoj (14).

### Jajčne celice, zaostale v metafazi II

Različne študije na jajčnih celicah po postopkih IVF in ICSI kažejo, da več kot 80 % neoplojenih jajčnih celic kljub vstopu semenčice vanje ostane v metafazi II (14–16). Metafaza II je očitno najbolj kritična faza v procesu oploditve. V tem stadiju se celični cikel zaustavi in jajčna celica čaka na oploditev. Ponovni zagon celičnega cikla je odvisen od semenčice oziroma njenega SAOAF. Le-ta predstavlja dražljaj za sprostitvev ionov  $Ca^{++}$  iz znotrajceličnih rezerv, ki ponovno aktivirajo celični cikel (17). V metafazi II pa ima jajčna celica tudi kontrolno točko celičnega

cikla. Za prehod te točke mora celica izpolnjevati zrelostne pogoje, sicer ostane v metafazi II. Med njimi omenjajo citoplazmatsko zrelost in razvit mehanizem za aktivacijo jajčne celice ter pravilno oblikovano in funkcionalno drugo mejotično delitveno vreteno s kondenziranimi kromosomi v njem (18, 19).







Sposobnost jajčne celice, da ob oploditvi sprosti zadostne količine ionov  $Ca^{++}$  iz zalog v citosol, se razvije v procesu oogeneze (20). Verjetno je torej, da mnoge jajčne celice v metafazi II, ki jih skušamo mehansko oploditi, še nimajo popolnega mehanizma sproščanja  $Ca^{++}$ . Lahko pa je prešibek tudi dražljaj SAOAF, ki ne doseže praga občutljivosti mehanizma sproščanja ionov  $Ca^{++}$ . Neučinkovitost SAOAF je lahko tudi vzrok neplodnosti (21). Za sprostitvev SAOAF iz semenčice je nujna nabreklost spermijeve glavice v citoplazmi jajčne celice (17).

### Kromatin semenčice in pripadajoči mikrotubuli v neaktiviranih jajčnih celicah

#### Nerazprta semenčica

Za uspešno vključevanje injicirane semenčice v jajčno celico je že pred postopkom ICSI treba poškodovati membrano semenčice na

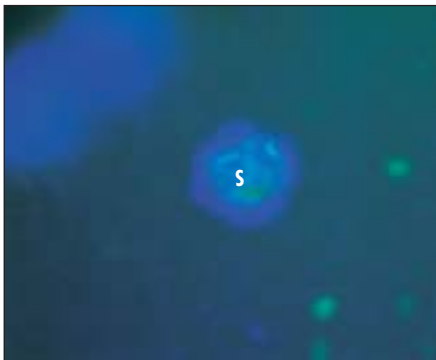
Tabela 1. Zastopanost posameznih oblik kromatina in mikrotubulov semenčice v neoplojenih jajčnih celicah, zaostalih v metafazi II, in hipotetična razlaga vzrokov za zastoj oploditve. MPF – mitozo promovirajoči faktor.

Stadij jajčne celice ob zastoju	Možni vzroki zastoja (jajčna celica)	MPF	Oblika semenčice v jajčni celici	Možni vzroki zastoja (semenčica)	Nikoli prisotne oblike semenčic
Neaktivirana jajčna celica v metafazi II	Nepopolna kondenzacija kromosomov	Aktiven		Mrtva semenčica	
	Poškodbe delitvenega vretena			Nepoškodovana membrana repa Denaturirana DNA	
	Nepopoln mehanizem za aktivacijo jajčne celice	Aktiven		Nefunkcionalno astralno žarkovje	
	Neaktiven SNDF			Neaktiven SAOAF	
		Aktiven		Neaktiven SAOAF	
					

njenem repu. Samo tako lahko nanjo vplivajo citoplazmatski faktorji iz jajčne celice. Semenčice, ki kljub poškodovanosti membrane ne začnejo z razprostiranjem kromatina v jajčni celici, so bile lahko preveč poškodovane in ob injiciranju niso bile več žive, ali pa so odraz drugih nepravilnosti semenčic oziroma jajčnih celic. Med njimi omenjajo slabo zaščito kromatina semenčice s protamini in/ali denaturacijo DNA; neučinkovitost proteaze v semenčici, sodelujoče pri nabrekanju glavice, in neučinkovitost SNDF, ki naj bi ga vsebovale jajčne celice (22–24). Razprostiranje semenčice je zatorej odvisno tako od nje same kot tudi od jajčne celice.

### Nabrekla glava semenčice

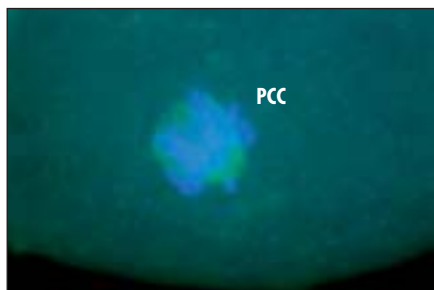
V večini injiciranih, vendar neoplojenih jajčnih celic se semenčice začnejo vključevati v jajčne celice, vendar se proces razprostiranja kromatina zaustavi v različnih fazah (tabela 1) (14). Pogosto najdemo v citoplazmi jajčne celice nabreklo glavico semenčice (slika 7), obdano z astralnimi mikrotubuli. Zaradi napak delovanja centrosoma semenčice se lahko mikrotubuli astralnega žarkovja prenehajo razraščati ali pa se sploh ne pojavijo, kar onemogoči popolno razvitje kromatina (4, 25).



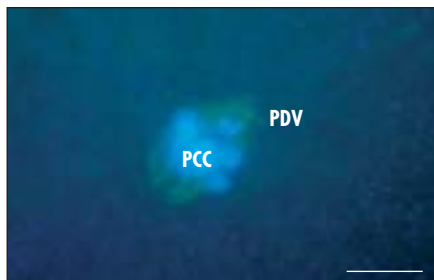
Slika 7. Nabrekla glavica semenčice (S).

### Predčasna kondenzacija kromosomov semenčice v fazi G1

Namesto razprostiranja glave semenčice lahko zasledimo obraten pojav predčasne kondenzacije kromosomov semenčice (slika 8 in 9), ko ima le-ta jedro še v fazi G1 (G1-PCC) (14). Pojav G1-PCC je najpogostej-



Slika 8. Predčasna kondenzacija kromosomov (PCC) semenčice. Kromatin se ni preoblikoval v moški pronukleus, ampak v kondenzirane kromatide. Okoli kromatid so mikrotubuli astralnega žarkovja semenčice.



Slika 9. Predčasno kondenzirani kromosomi (PCC) semenčice, obdani z bipolarnim očetovskim vretenom (PDV) (merilca = 10  $\mu$ m).

ši v metafaznih jajčnih celicah. Povzroča pa ga visoka aktivnost MPF, ki je značilna za neaktivirane jajčne celice, v katerih ohranja kromosome v metafazi (26).

### Očetovsko delitveno vreteno

Pojav G1-PCC večinoma spremlja tudi očetovsko delitveno vreteno. Mikrotubuli, ki izhajajo iz baze glavice semenčice, bi morali oblikovati unipolarno astralno žarkovje. V tem primeru pa nastane bipolarno delitveno vreteno s kondenziranimi kromatidami semenčice v ekvatorialni sredini. Ker delitev kromosomov ponavadi časovno sovпада s spremembami in delitvijo centrosomov, menijo, da visoko aktiven MPF vpliva tudi na podvojitve centrosoma. Razlogi za nastanek očetovskega delitvenega vretena v neaktiviranih jajčnih celicah so potemtakem verjetno enaki razlogom za nastanek pojava G1-PCC (4, 14).

## Pomejotično zaustavljene jajčne celice

Razvoj jajčne celice se redko zaustavi po aktivaciji in pred oblikovanjem pronukleusa. Takšni pojavi so kljub temu mogoči, saj je znano, da je ob nastanku pronukleusa in pred sintezo DNA naslednja kontrolna točka celičnega cikla. Celični cikel se ne nadaljuje, če kromosomi niso popolnoma razprostrti in če okoli njih ni oblikovana jedrna ovojnica (18).

Med pomejotično zaustavljene jajčne celice uvrščamo dve skupini celic: tiste, ki so izločile celotno kromosomsko maso v prvo ali drugo polarno telo, in jajčne celice, ki so ostale v anafazi ali telofazi druge redukcijske delitve in se v njih ni izoblikoval ženski pronukleus (14).

### Oblike semenčic v pomejotično zaustavljenih jajčnih celicah

V pomejotično zaustavljenih jajčnih celicah ne najdemo intaktnih semenčic (tabela 2). To dokazuje, da se mora glava semenčice za sprostitvev SAOAF vsaj delno razprostreti. Pogosta pa sta pojava G1-PCC in očetovsko delitveno vreteno, kar dokazuje, da v pome-

jotično zaustavljenih jajčnih celicah ostaja MPF pogosto v aktivni obliki.





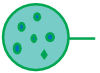
V primerih, ko se pri redukcijski delitvi iz jajčne celice izločijo vsi materni kromosomi, ostane v njih samo očetovski kromatin. Le-ta se skondenzira, centrosom semenčice pa se podvoji. Zaradi predčasne kondenzacije kromosomov kljub podvojitvi centrosomov ni mitotske delitve, zato se takšen androgenetski razvoj jajčne celice ustavi.

### Jajčne celice z enim pronukleusom

#### Androgenetske jajčne celice z moškim pronukleusom

V nekaterih jajčnih celicah se lahko ustvari-jo pogoji, ki omogočajo nastanek le moškega pronukleusa, prepoznavnega po pripetem spermijevem repu (14, 27). Najverjetneje se je v teh primerih jajčna celica aktivirala, bodisi spontano bodisi s SAOAF. Aktivnost MPF je upadla, materni kromosomi pa so se izločili v polarno telo ali pa se niso uspeli oblikovati v ženski pronukleus. V takšnih pogojih se semenčica lahko razvije do pronukleusa. Če se podvoji še centrosom semenčice, se tak-

Tabela 2. Zastopanost posameznih oblik spermijevega kromatina in mikrotubulov v neoplojenih jajčnih celicah, zaostalih v anafazi ali telofazi II, in hipotetična razlaga vzrokov za zastojo oploditve. MPF – mitozo promovirajoč faktor.

Stadij jajčne celice ob zastoju	Možni vzroki zastoja (jajčna celica)	MPF	Oblika semenčice v jajčni celici	Možni vzroki zastoja (semenčica)	Nikoli prisotne oblike semenčic
Jajčna celica v anafazi II oz. telofazi II	Izguba vseh maternih kromosomov	Neaktiven		Nefunkcionalno astralno žarkovje	
	Neoblikovanje pronukleusa			Neaktiven SAOAF	
	Nepopoln mehanizem za inaktivacijo MPF	Aktiven		Neaktiven SAOAF	
	Neaktiven SNDF	Ponovno aktiven		Napaka pri oblikovanju pronukleusa	
	Spontana aktivacija			Zakasnitev pri razvijanju kromatina	
		Neaktiven			



šna androgenetska jajčna celica verjetno lahko tudi mitotsko deli.

### Ginogenetske jajčne celice z ženskim pronukleusom

Pogosteje lahko zasledimo ginogenezo – pojav, ko jajčna celica nadaljuje razvoj brez semenčice. Pogoj za nastanek pronukleusa je inaktivacija MPF. Zaradi tega jajčne celice z enim ženskim pronukleusom nikoli ne vsebujejo kromosomov semenčice v obliki G1-PCC ali očetovskega delitvenega vretena (tabela 3). Analiza zigot z enim pronukleusom tudi kaže, da mnoge med njimi verjetno niso spontano aktivirane (14). Mnogo jih namreč poleg ženskega pronukleusa vsebuje tudi razprostrt kromatin semenčice in bi po tem sodeč lahko bile aktivirane tudi s SAOAF. Očitno se v ginogenezo lahko sprevrže tudi pravilno začeti proces oploditve, ko se razprostiranje kromatina semenčice zaustavi. Do zaustavitve lahko pride zaradi nepravilnosti centrosoma semenčice in napak pri oblikovanju in delovanju pripadajočih astralnih mikrotubulov (4).







Lahko pa je zaustavitev razprostiranja semenčice tudi posledica asinhronega nast-

janja moškega in ženskega pronukleusa. Ko razprostiranje očetovskih kromosomov precej kasni za razprostiranjem maternih kromosomov, se lahko aktivnost MPF še pred oblikovanjem moškega pronukleusa ponovno zviša, kar onemogoči nastanek jedrne ovojnice okoli novo nastajajočega moškega pronukleusa, saj MPF razgrajuje jedrni lamin (28). Visoko aktiven MPF povzroči še pojav PCC – stanja na že delno razprostrtem kromatinu semenčice, ko je ta že v fazi S. Zanj so značilne drobne zgostitve kromatina (oblika S-PCC) (29).

### ZAKLJUČEK

Proces vključevanja semenčice v citoplazmo jajčne celice se začne pogosteje, kot je opazno s svetlobno mikroskopijo, vendar se pogosto zaustavi še pred oblikovanjem moškega pronukleusa. Vzroki za nezdružitev starševskih genomov v jajčni celici so številni in lahko hkrati izhajajo iz semenčice in jajčne celice. Najpogostejši vzrok za zaustavitev razprostiranja semenčic v jajčnih celicah je neaktiviranje ali nezadostno aktiviranje jajčne celice in ohranena aktivnost njenega

Tabela 3. Zastopanost posameznih oblik kromatina in mikrotubulov semenčice v neoplojenih jajčnih celicah z enim ženskim pronukleusom in hipotetična razlaga vzrokov za zastoj oploditve.

Stadij jajčne celice ob zastoju	Možni vzroki zastoja (jajčna celica)	MPF	Oblika semenčice v jajčni celici	Možni vzroki zastoja (semenčica)	Nikoli prisotne oblike semenčic
Aktivirana jajčna celica z ženskim pronukleusom	Spontana aktivacija	Neaktiven		Mrtva semenčica  Nepoškodovana membrana repa  Denaturirana DNA	
	Neaktiven SNDF	Neaktiven		Nefunkcionalno astralno žarkovje	
		Neaktiven		Napaka pri oblikovanju pronukleusa  Zakasnitev pri dekonenzaciji semenčice	
		Neaktiven		Nefunkcionalno astralno žarkovje	

MPF, ki povzroči predčasno kondenziranje spermijevih kromosomov. V teh primerih se namesto astralnega žarkovja večinoma oblikujejo bipolarna očetovska delitvena vretena. Med pogostejšimi napakami v procesu združe-

vanja starševskih genomov je tudi asinhronija v nastajanju moškega in ženskega pronukleusa. Podatki o konfiguraciji kromatina in mikrotubulov v posamezni jajčni celici nam pomagajo pri iskanju možnih vzrokov neoplojenosti.

## LITERATURA

1. Simerly C, Navara C, Wu G-J, Schatten G. Cytoskeletal organization and dynamics in mammalian oocytes during maturation and fertilization. In: Grudzinskas JG, Yovich JL, eds. *Gametes - The Oocyte*. New York: Cambridge U Pr; 1995. p. 54.
2. Stearns T, Kirschner M. In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of  $\gamma$ -tubulin. *Cell* 1994; 76: 623-37.
3. Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, Jung MK.  $\gamma$ -tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 1990; 61: 1289-301.
4. Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol* 1994; 165: 299-335.
5. Colleu D, Lescoat D, Thomas D, Gouranton J. Changes in protamine 1 distribution in human sperm nucleus during in vitro sperm-oocyte interaction: an immunoelectron microscopic study. *Fertil Steril* 1997; 67: 123-8.
6. Lewin B. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners and substrates. *Cell* 1990; 61: 743-52.
7. Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 1998; 282: 487-90.
8. Hashimoto H, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation - promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1988; 126: 242-52.
9. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 177: 129-46.
10. Holloway SL, Glotzer M, King RW, Murray AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 1993; 73: 1393-402.
11. Homa ST, Swann KA cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod* 1994; 9: 2356-61.
12. Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod* 1995; 10: 403-7.
13. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 1997; 12: 2792-6.
14. Kovacic B, Vlasisavljevic V. Configuration of maternal and paternal chromatin and pertaining microtubules in human oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 197-204.
15. Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod* 1995; 10: 1897-906.
16. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 2623-9.
17. Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 3012-7.
18. Whitaker M, Patel R. Calcium and cell cycle control. *Development* 1990; 108: 525-42.
19. Sluder G. Role of spindle microtubules in the control of cell cycle timing. *J Cell Biol* 1979; 80: 674-91.
20. Carroll J, Jones KT, Whittingham DG.  $Ca^{2+}$  release and the development of  $Ca^{2+}$  release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization. *Rev Reprod* 1996; 1: 137-43.
21. Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De Sutter P, Dhont M. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril* 1997; 68: 1144-7.
22. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 837-43.
23. Zirkin BR, Chang TSK, Heaps J. Involvement of acrosin-like proteinase in the sulfhydryl-induced degradation of rabbit sperm nuclear protamine. *J Cell Biol* 1980; 85: 116-21.
24. Usui N, Yanagimachi R. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development: *J Ultrastruct Res* 1976; 57: 276-88.
25. Van Blerkom J. Sperm centrosome dysfunction: a possible new class of male infertility in the human. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 349-54.

26. Plachot M. Chromosome analysis of oocytes and embryos. In: Verlinsky Y, Kuliev A, eds. *Preimplantation Genetics*. New York: Plenum Pr; 1991. p. 103–12.
27. Balakier H, Squire J, Casper RF. Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1993; 8: 404–8.
28. Usui N, Ogura A, Kimura Y, Yanagimachi R. Sperm nuclear envelope: breakdown of intrinsic envelope and de novo formation in hamster oocytes or eggs. *Zygote*, 1997; 5: 35–46.
29. Schmiady H, Kantenich H. Premature chromosome condensation after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1989; 4: 689–95.

Prispelo 10. 8. 2000