

TARTU ÜLIKOOL  
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**LÄBIVOOLU TSÜTOMEETRIAL PÕHINEVATE SEEMNERAKKUDE  
ANALÜÜSIMEETODITE TÄHTSUS LASTETUSE RAVI  
TULEMUSTE PROGNOOSIMISEL**

TRIIN MÖLTER

Magistritöö

Juhendajad:

Andres Salumets, *Ph.D.*

Toivo Maimets, *Ph.D.*

TARTU 2006

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Viljatuse mõiste .....	7
1.2. Mehepoolne viljatus.....	7
1.2.1. Mehepoolse viljatuse diagnoosimine.....	7
1.2.2. Seemnevedeliku analüüsil hinnatavad kriteeriumid .....	8
1.3. Spermatogenees .....	10
1.4. Spermatoosid.....	12
1.4.1. Seemnerakkude kromatiini struktuur.....	13
1.4.2. DNA-katked seemnerakkudes .....	14
1.4.3. Seemnerakkude DNA metüleeritus.....	15
1.5. Munarakk .....	17
1.6. Viljastumine.....	18
1.6.1. Seemneraku adaptatsioon.....	18
1.6.2. Seemneraku seondumine munarakule.....	18
1.6.3. Akrosoomi reaktsioon ja munaraku plasmamembraani läbimine.....	19
1.6.4. Kiire ja aeglane blokk tõkestamiseks polüspermiat .....	19
1.6.5. Viljastunud munarakk ehk sügoot .....	20
1.7. Mehepoolset viljatust põhjustavad tegurid .....	20
1.7.1. Testikulaarsed probleemid .....	20
1.7.2. Krüptorhism .....	21
1.7.3. Seemnerakkude vastased antikehad.....	21
1.7.4. Geneetilised defektid .....	22
1.7.5. Reaktiivsete hapniku ühendite produktsioon spermas.....	23
1.7.6. Muud põhjused.....	24
1.8. Viljatuse ravi võimalused .....	24
1.8.1. Viljatusravi tulemuslikkust mõjutavad tegurid.....	26
1.8.2. Seemnerakkude kvaliteedi hindamine läbivoolu tsütomeetria abil ning viljatusravi tulemuslikkus .....	26
TÖÖ EESMÄRGID .....	29
EKSPERIMENTAALNE OSA .....	30
2.1. Materjalid ja meetodid .....	30
2.1.1. Seemnevedeliku kogumine ja säilitamine.....	30
2.1.2. Seemnerakkude DNA analüüs SCSA meetodil.....	30
2.1.2.1. Seemnerakkude ettevalmistus SCSA analüüsiks .....	30
2.1.2.2. SCSA meetod läbivoolu tsütomeetrial.....	31
2.1.3. Seemnerakkude DNA metüleerituse määramine .....	32
2.1.3.1. Seemnerakkude ettevalmistus DNA metülatsiooni uuringuks .....	32
2.1.3.2. Metüleerituse määramine läbivoolu tsütomeetrial.....	33
2.1.4. Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi hindamine .....	36
2.1.4.1. Seemnerakkude ettevalmistus akrosoomi kvaliteedi hindamiseks .....	36
2.1.4.2. Akrosoomi kvaliteedi hindamine läbivoolu tsütomeetrial.....	37
2.1.5. Sperma leukotsüütide detekteerimine .....	38
2.1.5.1. Sperma leukotsüütide ettevalmistus läbivoolu tsütomeetria uuringuks... 38	
2.1.5.2. Sperma leukotsüütide detekteerimine läbivoolu tsütomeetrial.....	40

2.1.6. Tulemuste analüüs .....	41
TULEMUSED .....	42
3.1. Seemnerakkude DNA analüüs SCSA meetodil .....	42
3.2. Seemnerakkude DNA metülatsiooni mõju kehavälise viljastamise tulemustele ...	46
3.3. Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi hindamine .....	48
3.4. Sperma leukotsüütide detekteerimine .....	49
ARUTELU .....	51
4.1. Seemnerakkude DNA analüüs SCSA meetodil .....	51
4.2. Seemnerakkude DNA metülatsiooni mõju kehavälise viljastamise tulemustele ...	53
4.3. Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi hindamine .....	54
4.4. Sperma leukotsüütide detekteerimine .....	55
KOKKUVÕTE .....	56
SUMMARY .....	57
TÄNUAVALDUSED .....	58
KASUTATUD KIRJANDUS .....	59

## KASUTATUD LÜHENDID

7AAD	<i>7 Aminoactinomycin D (7 aminoaktinomütsiin D)</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin (veise seerumalbumiin)</i>
DFI	<i>DNA Fragmentation Index (DNA fragmentatsiooni indeks)</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid (desoksüribonukleïinhape)</i>
FITC	<i>Fluoresceine Isothiocyanate (fluorestsiin isotiotsüanaat)</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone (folliikuleid stimuleeriv hormoon)</i>
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin (inimese kooriongonadotropiin)</i>
HDS	<i>High DNA Stainability (kõrge DNA värvumus)</i>
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection (intratsütoplasmaatiline spermi injektsioon)</i>
IVF	<i>In Vitro Fertilization (in vitro e. kehaväline viljastamine)</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline (fosfaatpuhvriga soolalahus)</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species (reaktiivsed hapniku osakesed)</i>
RPE	<i>R-phycoerythrin (R-fükoerütriin)</i>
SCSA	<i>Sperm Chromatin Structure Assay (spermi kromatiini struktuuri analüüs)</i>
SD	<i>Standard Deviation (standardhälve)</i>
Topo II	<i>Topoisomerase II (topoisomeraas II)</i>
WHO	<i>World Health Organization (Maailma Tervishoiuorganisatsioon)</i>

## SISSEJUHATUS

Lastetus on laialdane meditsiiniline probleem, mis puudutab kuni 20 % paaridest. Lastetuse ravimeetodeid on väga mitmekülgeid, kuid kõige paremaid tulemusi annab siiski kehaväline viljastamine e. IVF-protseduur (*In Vitro Fertilization*). IVF-protseduuri kasutamise tagajärjel sündis esimene laps maailmas 1978. a. ning Eestis 1994. a. Aasta aastalt on IVF-protseduuri kasutamine suurenenud. Käesoleval hetkel teostatakse Eestis umbes 600 IVF-protseduuri aastas ning selle abil sünnib aastas ligi 200 last.

IVF-protseduur võib olla näidustatud nii naise- kui ka mehepoolse viljatuse esinemise korral. Mehepoolse viljatuse ravis on kasutusel IVF-protseduuri erimeetod, mille korral süstitakse seemnerakk otse munaraku tsütoplasmasse (*ICSI e. Intracytoplasmic Sperm Injection*). IVF- ja ICSI-protseduuri kasutamise tulemusena rasedust ja sünnitab lapse keskmiselt 25 – 30 % naistest. Protseduuri ebaõnnestumisel on võimalik aga lastetuse raviprotseduuri korrata.

IVF- ja ICSI-protseduuride edukus sõltub paljudest erinevatest kliinilistest faktoritest. Üheks tähtsamaks lastetuse ravi edukust mõjutavaks teguriks on naise vanus ning paari lastetuse põhjus. Siiski on viimasel kümnendil läbi viidud uuringud selgelt näidanud seemnerakkude kvaliteedi olulisust IVF- ja ICSI-protseduuride õnnestumisel. Uuringud on näidanud, et seemnerakkude kvaliteedist sõltuvad nii munarakkude viljastumine, embrüote *in vitro* areng ja implanteerumine kui ka raseduse (loote) areng.

Traditsiooniliselt on seemnerakkude kvaliteedi hindamisel kasutusel valgusmikroskoopiaal baseeruvad uurimismeetodid. Seemnerakkude mikroskoopilisel analüüsil on võimalik saada informatsiooni seemnerakkude kontsentratsiooni, liikuvuse ja morfoloogia kohta. Kõik mikroskoopiliselt kirjeldatavad seemnerakkude näitajad on küll tähtsad lastetuse põhjuste diagnoosimisel, kuid võimaldavad siiski küllaltki vähe prognoosida lastetuse ravimeetodite rasedustulemusi. Viimastel aastatel on mitmed uuringud kinnitanud, et seemneraku DNA kvaliteet (intaktsus ja epigeneetilised modifikatsioonid) on üheks tähtsaks lastetuse ravimeetodite

tulemuslikkust mõjutavaks teguriks. Seemnerakkude DNA kvaliteedi uuringutes on võimalik edukalt kasutada voolutsütomeetrial põhinevaid uurimismeetodeid.

Käesolevas töös võtsime esmakordselt Eestis kasutusele ning juurutasime täiesti uusi voolutsütomeetrial põhinevaid seemnerakkude analüüsimeetodeid. Täpsemalt uurisime voolutsütomeetrial põhinevate meetoditega seemnerakkude DNA intaktsust ja metüleeritust, seemnerakkude akrosoomi piirkonna (vastutab seemneraku seostumise eest munarakule) kvaliteeti ning leukotsüütide esinemist spermas. Järgnevas andmete analüüsis uurisime nimetatud sperma kvaliteedinäitajate seoseid kehavälise viljastamise üldise tulemuslikkusega (munarakkude viljastumisega ja patsientide rasestumisega).

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Viljatuse mõiste

Viljatuseks nimetatakse meditsiinilist olukorda, kui naine ei ole ühe aasta jooksul rasestunud, kuigi paar ei ole kasutanud rasestumisvastaseid vahendeid. Lastetus on laialdane meditsiiniline probleem, millega puutub kokku ligikaudu 15 – 20 % paaridest. Seega võib Eestis olla ~20 000 lastetut paari, kuid täpsem ülevaade antud probleemi ulatusest puudub. Viljatust võib jagada primaarseks ja sekundaarseks. Primaarse viljatuse korral ei ole paaril esinenud ühtegi rasedust. Sekundaarse viljatuse korral ei ole aga eelnevatele rasedustele järgnenud uusi rasedusi (Saulsbery and Pohlhaus 1992).

Paari viljakust mõjutavad mitmed tegurid, sealhulgas partnerite vanus, tervislik seisund ning ennekõike suguelundite normaalne funktsioneerimine. Last sooviva paari viljatus võib olla tingitud nii naise- kui ka mehepoolsest viljatusest. Viljatuse põhjused jagunevad kogu maailma praktika põhjal naisepoolseteks (40 %), mehepoolseteks (40 %), mõlemapoolseteks (10 %) ning teadmata põhjusega (10 %) infertiilsuseks.

## 1.2. Mehepoolne viljatus

Vaatamata meditsiini kiirele arengule on meeste viljatuse põhjuste uurimisel oluliselt vähem võimalusi kui naise viljatuse põhjuste väljaselgitamisel.

### 1.2.1. Mehepoolse viljatuse diagnoosimine

Mehepoolse viljatuse diagnoosimisel on tähtsal kohal patsiendi füüsiline läbivaatus ning anamneesi koostamine. Mehepoolse viljatuse anamneesi seisukohalt on tähtsad läbi põetud ning esinevad haigused, traumad, operatsioonid ning elustiili faktorid. Seejärel sooritatakse vajalikud laboratoorsed uuringud, milledest tähtsaimad on vereseerumi hormonaalsed (testosteroon ja gonadotropiinid), geneetilised (kromosoomide uuring) ning sperma analüüs (seemnerakkude kontsentratsiooni,

liikuvuse ja morfoloogia uuringud). Eriti tähtis mehepoolse viljatuse diagnoosimisel on seemnerakkude analüüs (WHO 2000). Seemnerakkude kvaliteedi hindamisel lähtutakse Maailma Tervishoiuorganisatsiooni e. WHO (*World Health Organization*) normidest. Seemnerakkude analüüs baseerub mikroskoopia meetoditel, mille käigus hinnatakse seemnevedeliku e. ejakulaadi mahtu, seemnerakkude kontsentratsiooni, liikuvust ja morfoloogiat. Saadud informatsioon on küll limiteeritud, kuid annab siiski olulist kliinilist informatsiooni mehe viljatusprobleemi ulatusest. Lisaks on seemnevedelikust võimalik määrata spermas esinevate leukotsüütide kontsentratsiooni ning seemnerakkude vastaste autoantikehade esinemist. Leukotsüütide esinemine spermas viitab suguteedes esinevatele põletikulistele protsessidele (WHO 2000). Siiski on rutiinsel, valgusmikroskoopial põhineval seemnerakkude analüüsil, mitmeid olulisi puudusi. Esiteks on uuringud näidanud, et seemnevedeliku analüüsi parameetrite ning mehe viljakuse vahel esineb suhteliselt nõrk seos (Guzick et al. 2001). Näiteks võivad defektsed seemnerakud näida valgusmikroskoobis morfoloogiliselt normaalsetena, kuigi nende viljastamisvõime on alanenud (Nikoletos et al. 1999). Teiseks puuduseks on laboritulemuste suur varieeruvus e. subjektiivsus (Coetzee et al. 1999). Kuigi valgusmikroskoopial põhinevad meetodid on küllaltki subjektiivsed ja uuritavate rakkude arv madal (kuni paarsada rakku) on siiski tegemist tavameditsiinis kättesaadava diagnostikameetodiga, mis aitab kindlaks teha mehe viljatusprobleemi olemust ning planeerida vastavalt ravi.

### **1.2.2. Seemnevedeliku analüüsil hinnatavad kriteeriumid**

Rutiinsel seemnevedeliku analüüsil hinnatakse seemnerakkude liikuvust, kontsentratsiooni ja morfoloogiat vastavalt WHO kriteeriumitele (WHO 2000).

Seemnerakkude liikuvuse hindamisel jagatakse seemnerakud nelja klassi vastavalt seemnerakkude liikumiskiirusele (WHO 2000) : A - kiiresti ja progresseeruvalt liikuvad seemnerakud, liikumiskiirusega  $\geq 25 \mu\text{m/s}$ ; B - aeglaselt ja progresseeruvalt liikuvad seemnerakud, liikumiskiirusega  $< 25 \mu\text{m/s}$ ; C - kohapeal liikuvad seemnerakud ja D - liikumatud seemnerakud.

Hea liikuvusega seemnerakkude prooviks loetakse analüüsi, kus A liikuvaid seemnerakke on  $\geq 25 \%$  või A + B liikuvaid seemnerakke on  $\geq 50 \%$ . Seemnerakkude liikumatus korral on takistatud munaraku viljastumine, mistõttu on seemnerakkude



liikuvus üks tähtsamaid näitajaid naise rasestumisel (Jeyendran 2000). Lisaks on oluline, et seemnerakkude liikuvus halveneb oluliselt aja jooksul, mistõttu peaks sperma proovi andmisest kuni selle hindamiseni kuluma vähem kui 1 tund (Jorgensen et al. 2001).

Seemnerakkude kontsentratsiooni hindamisel antakse tulemus seemnerakkude arvuna miljonites 1 ml seemnevedelikus. Kontsentratsiooni hindamisel on kasutusel mitmeid erinevaid kalibreeritud mõõtmiskambreid, milledest on kõige rohkem kasutust leidnud Makleri ja Neubaueri kambrid. Uuringud on näidanud, et mehe viljakus väheneb oluliselt, kui seemnerakkude kontsentratsioon on  $< 40 \times 10^6$  seemnerakku 1 ml seemnevedelikus. Järgnev viljakuse hüppeline vähenemine toimub kontsentratsioonil  $< 20 \times 10^6$  seemnerakku 1 ml seemnevedelikus. Juhul, kui seemnerakkude kontsentratsioon on  $< 10 \times 10^6$  seemnerakku 1 ml spermas on loomulikult teel rasestumine väga vähetõenäoline. Seemnerakkude kontsentratsioon  $\leq 5 \times 10^6$  seemnerakku 1 ml spermas on piiriks, alates millest on seemnevedeliku patoloogia tekkes oluline osa geneetilistel põhjustel (Punab et al. 2003).

Morfoloogia hindamisel jagatakse seemnerakk kolmeks rakupiirkonnaks: peaosa, keskosa ning sabaosa. Seejärel määratakse missuguses seemneraku piirkonnas esineb morfoloogiline defekt. Vigade puudumisel hinnatakse seemnerakk normaalseks (WHO 2000).

**Tabel 1.** Seemnerakkude kvaliteedi klassifikatsioon lähtuvalt seemnerakkude kontsentratsioonist, liikuvusest ning morfoloogiast (WHO 2000)

Diagnoos	Seemnerakkude kvaliteedinäitajad
Normozoospermia	Kontsentratsioon: $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$ Liikuvus: $A \geq 25 \%$ ja/või $A + B \geq 50 \%$ Morfoloogia: normaalseid seemnerakke $> 5 \%$
Oligozoospermia	Kontsentratsioon: $< 20 \times 10^6/\text{ml}$
Asthenozoospermia	Liikuvus: $A < 25 \%$ ja/või $A + B < 50 \%$
Teratozoospermia	Morfoloogia: normaalseid seemnerakke $< 5 \%$
Oligoasthenoteratozoospermia	Kontsentratsioon: $< 20 \times 10^6/\text{ml}$ Liikuvus: $A < 25 \%$ ja/või $A + B < 50 \%$ Morfoloogia: normaalseid seemnerakke $< 5 \%$
Azoospermia	Seemnerakke ejakulaadis ei leidu
Aspermia	Ejakulaat puudub
Leukotsütospermia	Leukotsüüte: $\geq 1 \times 10^6/\text{ml}$

### 1.3. Spermatogenees

Spermatogenees on keeruline bioloogiline protsess, mille tulemusena valmivad testistes seemnerakud. Kokkuvõtlikult saab antud protsessi jagada kolmeks etapiks: (i) spermatogoonide paljunemine mitoosi abil; (ii) meiotiline jagunemine, mille käigus tekivad diploidsetest rakkudest haploidsed rakud ja (iii) rakkude diferentseerumine, mille käigus tekivad spermatiididest spermatosoidid.

Imetajatel toimub spermatogenees testistes paiknevates väänilistes seemnetorukestes. Seemnetorukeste seintes, vahetult basaalmembraanil, asetsevad diferentseerumata tüvirakud e. spermatogoonid. Spermatogoonide mitootilise jagunemise tulemusena tekivad kahte tüüpi spermatogoonid: A spermatogoonid (mitootiliselt jagunevad tüvirakud) ja B spermatogoonid (diferentseeruvad primaarseteks spermatotsüütideks). A spermatogoonid jäävad spermatogoonideks ning ei diferentseeru, moodustades testise tüvirakkude varu, millest omakorda mitootiliste rakujagunemiste käigus tekivad A ja B tüüpi spermatogoonid. B tüüpi spermatogoonidest nende viimase

mitootilise rakujagunemise käigus tekkinud primaarsed spermatotsüüdid sisaldavad kaks korda rohkem DNA-d (*Deoxyribonucleic Acid*) kui diploidsed somaatilised rakud e.  $2 \times 2n$ . Järgmises etapis jagunevad primaarsed spermatotsüüdid meioosi esimeses jagunemises sekundaarseteks spermatotsüütideks, mis sisaldavad kahte kromosoomistiku koopiat e.  $2 \times 1n$ . Seejärel jagunevad sekundaarsed spermatotsüüdid meioosi teise jagunemise käigus spermatiidideks, mis sisaldavad ainult ühte kromosoomistiku koopiat e.  $1n$ .

Spermatogeneesile on iseloomulikuks, et rakujagunemiste käigus ei toimu lõplikku tsütokineesi. Seetõttu moodustavad ühest spermatogoonist tekkinud tütararakud süntsüütiume, mis on omavahel ühendatud tsütoplasmaatiliste sildadega. Tütararakud jäävad tsütoplasmaatiliste sildadega ühendatuks kogu diferentseerumisperioodi vältel, vabanedes alles diferentseerunud spermatosoididena vääniliste seemnetorukeste luumenisse (Alberts et al. 2002). Kuna enamus diferentseerumisprotsessidest toimub postmeiootiliselt, võimaldavad tsütoplasmaatilised sillad haploidsetel seemnerakkudel funktsioneerida diploidsetena. See võimaldab ühe raku poolt toodetud geeniprodukte kasutada ka naaberrakkudel ning seemnerakkude diferentseerumine on sarnaselt munaraku diferentseerumisele juhitud diploidse genoomi poolt (Braun et al. 1989).

Spermatiidide transformeerumist seemnerakkudeks nimetatakse spermigeneesiks. Spermigeneesi käigus moodustub ümara kujuga spermatiidist mitmete diferentseerumisprotsesside käigus liikumis- ja adheerumisvõimeline seemnerakk. Spermigeneesi üheks tähtsaimaks protsessiks on spermi DNA ümberpakkimine, milles osaleb DNA topoisomeraas II (*Topo II e. Topoisomerase II*). Topo II teeb spermi DNA-sse kaheaheelalisi katkeid, mis seejärel ligeeritakse. Uuringud on näidanud, et diferentseeruvates spermatiidides esineb palju DNA-katkeid ning DNA topoisomeraas II-te (McPherson and Longo 1993). Lisaks asendatakse DNA ümberpakkimise käigus ka histoonid protamiinidega. Transkriptsiooni protamiini kodeerivatelt geenidelt on tuvastatud juba spermatiidides (Peschon et al. 1987).

Seemneraku tuuma etteotsa moodustub Golgi-kompleksi vesiikulitest lüsoosomi-taoline moodustis – akrosoom, mis on vajalik seemneraku seondumiseks munaraku kestale ning selle läbimiseks. Seemneraku kaelaossa liiguvad mitokondrid ja kaks tsentriooli. Üks seemneraku kaelaosas asetsevatest tsentrioolidest moodustab spermi viburi aksoneemi, mis koosneb  $9 \times 2$  perifeersest ja 2 tsentraalsest mikrotorukesest.

Spermiogeneesi lõppfaasis fagotsüteeritakse Sertoli rakkude poolt enamuse spermi tsütoplasmast ja spermatiid muutub viljastamisvõimeliseks spermatooidiks. Diferentseerunud spermatooidid vabastatakse seemnetorukeste luumenisse ning seejärel suunduvad spermid mööda seemnejuha valendikku munandimanusesse e. epididümisse. Epididümises toimub seemnerakkude kogunemine, küpsemine ja säilitamine (Alberts et al. 2002).

Spermatogeneesi on täpselt hormonaalselt reguleeritud protsess. Lisaks omavad spermatogeneesis suurt tähtsust rakk-rakk interaktsioonid, milledest olulisemad on Sertoli rakkude ja spermatoogoonide omavahelised interaktsioonid. Sertoli rakud asetsevad seemnetorukeste basaalmembraani läheduses. Sertoli rakud on eukromatiinse tuuma ja suure tuumakesega rakud, millede peamiseks funktsiooniks on spermatogeneesi regulatsioon. Samuti produtseerivad Sertoli rakud östrogeene - naissuguhormoone, mis on teatavas kontsentratsioonis vajalikud spermatogeneesi toimumiseks (Pentikainen et al. 2000). Lisaks abistavad Sertoli rakud seemnerakke liikumisel seemnetorukeste luumenisse ning kaitsevad neid enneaegse akrooomireaktsiooni toimumise eest, säilitades seeläbi seemnerakkude viljastamisvõimet. Seemnetorukeste vahel asetsevad interstitsiaalsed e. Leydigi rakud, millede peamiseks funktsiooniks on testosterooni produtseerimine. Sertoli ja Leydigi rakkude funktsiooni reguleerivad hüpofüüsi eessagara rakkudes produtseeritud FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) ja LH (*Luteinizing Hormone*) gonadotroopsed hormoonid. Spermatogeneesi tsükkel kestab täiskasvanud mehel ca 65-75 päeva ning terve elu jooksul produtseerib mees kuni  $10^{13}$  seemnerakku.

#### **1.4. Spermatooid**

Seemnerakk on munarakust ligi 25 korda väiksem rakk. Seemneraku pea on 4 - 5  $\mu\text{m}$  pikk ning koos sabaga on seemnerakk keskmiselt 45  $\mu\text{m}$  pikk. Seemnerakk koosneb haploidsest tuumast, akrooomist, mitokondritest ja aksoneemist. Enamus seemneraku tsütoplasmast on diferentseerumisprotsessi käigus eraldatud. Spermiogeneesi käigus omandab seemneraku haploidne tuum voolujoonelise kuju ning tema DNA pakitakse tihedalt kokku. Seemnerakkudes on kromatiin pakitud kuus korda kompaktsemalt kui somaatilistes metafaasi staadiumi kromosoomides (Ward and Coffey 1991). Tuuma

ees paikneb akrosomaalne vesiikul, mis on tekkinud Golgi kompleksist ja mis sisaldab valke ja suhkruid lagundavaid ensüüme. Akrosoomi abil toimub munarakku ümbritsevate kestade lagundamine, mis võimaldab seemnerakul tungida munarakku. Liikumisfunktsiooni täitmiseks on seemnerakul vibur, mida läbib viburi toes e. aksoneem. Aksoneem koosneb kahest tsentraalsest mikrotuubulist, mis pärinevad seemneraku tuuma alaosas asetsevast tsentrioolist. Tsentraalsete mikrotuubulite ümber asetsevad üheksa mikrotuubuli dubletti, milledele kinnituvad düneiini molekulid. Düneiin hüdrolüüsib ATP (*Adenosine Triphosphate*) molekule ja konverteerib keemilise energia seemneraku saba mehhaaniliseks liikumiseks. Vajalik ATP tekib aga seemneraku keskosas asetsevates mitokondrites (Gilbert 1994). Seemnerakud väljuvad mehe seemnejuhast koos seminaalplasmaga, moodustades seemnevedeliku (Mortimer 1994).

#### **1.4.1. Seemnerakkude kromatiini struktuur**

Seemnerakkude kromatiin on kõrgelt organiseeritud kompaktnen struktuur, mis koosneb DNA-st ning heterogeensetest nukleoproteiinidest (Alberts et al. 2002). Seemneraku kromatiini kondenseeritud olemus kaitseb spermi genoomi tema transpordil läbi mehe ja naise suguteede. Võrreldes teiste liikidega on inimese seemnerakkude kromatiini struktuur erakordselt varieeruv nii interindividuaalselt kui ka ühe ja sama indiviidi erinevates ejakulaatides (Jager 1990). Nimelt võib tiheda, homogeense kromatiini struktuuri kõrval esineda suhteliselt sageli jämedakoelist, granulaarset või vakuole sisaldavat kromatiini (Jager 1990). Sellist jämedakoelist, granulaarset struktuuri võib leida ka morfoloogiliselt normaalsetest seemnerakkudest ning kuna sarnast struktuuri on täheldatud teiste liikide hilistes spermatiidides, arvatakse, et sellise kromatiini olemasolu, võib olla ebaküpsete seemnerakkude markeriks. Seemnerakkude ebaküpsus seevastu võib aga olla tingitud epididüümises oldud ebapiisavast ajast (Seligman et al. 1994).

Samuti võib seemnerakkudes varieeruda protamiinide sisaldus (Jager 1990). Erinevalt teistest liikidest, kelle seemnerakkude kromatiin sisaldab vaid üht tüüpi protamiine - P1 (*Protamine 1*), esineb inimese seemnerakkudes lisaks veel ka teist tüüpi protamiine - P2 (*Protamine 2*). P2 sisaldab vähem tsüsteiini, mistõttu sisaldab meeste seemnerakkude kromatiin vähem vabu tiolrühmi ja sellest tulenevalt on

disulfiidsildade moodustumine raskendatud. Tsüsteiini suhteliselt madalam esinemissagedus P2 protamiinides muudab inimese seemnerakkude kromatiini vähem stabiilseks võrreldes teiste liikidega, kellede kromatiin sisaldab ainult P1-tüüpi protamiine (Jager 1990). Lisaks, sünteesitakse P2 protamiine prekursoritena, mis modifitseeritakse alles pärast nende assotsieerumist DNA-ga. Seetõttu võivad kõrvalekalded P2 prekursori proteolüüsis osutada üheks seemnerakkude kromatiini heterogeensuse ning sellest tuleneva viljatuse põhjuseks (Evenson et al. 2000). Hälbed seemneraku genoomi kokku pakkimises võimaldavad küll edukat munarakkude viljastumist, kuid võivad põhjustada probleeme viljastumisjärgses arengus (Sakkas et al. 1999).

#### **1.4.2. DNA-katked seemnerakkudes**

Spermatogeneesi patoloogilised muutused põhjustavad ebaküpsete ning ebanormaalsete seemnerakkude jõudmise ejakulaati. Ebaküpsed seemnerakud omavad suuremal hulgal DNA kahjustusi, nende kromatiin ei ole korrektselt kokku pakkunud ning nad toodavad liigselt reaktiivseid hapniku ühendeid (*Reactive Oxygen Species e. ROS*) (Evenson et al. 2000).

Eelnevalt on püstitatud kolm hüpoteesi, millega saab seletada DNA-kahjustuste tekkimist seemnerakkudes. Esiteks arvatakse, et DNA kahjustused võivad olla tingitud spermioogeneesi protsessis toimunud ebakorrektselt kromatiini kokku pakkimisest (Sailer et al. 1995). Nimetatud probleem võib tuleneda Topo II puudulikkusest DNA ligeerimisaktiivsusest (McPherson and Longo 1993). Teiseks soodustab DNA kahjustuste teket oksüdatiivne stress, mida põhjustavad reaktiivsed hapniku ühendid (Agarwal et al. 2003). Peamiseks ROS-i allikaks seemnevedelikus on nii seemnerakud ise kui ka põletikuliste protsesside tõttu seminaalplasmas esinevad leukotsüüdid (Pasqualotto et al. 2000). Teatud määral on ROS-i tootmine seemnerakkudele vajalik normaalsetes füsioloogilistes protsessides (seemnerakkude kohanemine suguteedes ning akrosoomi reaktsiooni toimumine) (de Lamirande and Gagnon 1993). Liigne ROS-i tootmine võib aga kahjustada spermigeenoomi, põhjustades nii ühe- kui ka kaheaahelalisi DNA katkeid (Twigg et al. 1998). Seemneraku DNA on oksüdatiivse stressi eest kaitsetu, kuna seemnevedeliku antioksüdantid on suhteliselt nõrgad (Aitken et al. 1996) ning küpsetes

seemnerakkudes puuduvad täielikult DNA-d repareerivad ensüümid (Matsuda et al. 1989). Kolmanda teooria kohaselt arvatakse, et märkimisväärselt tekitavad seemnerakkude DNA katkeid apoptootilised protsessid (Sakkas et al. 2002). Apoptoos täidab normaalses spermatogeneesis kahte funktsiooni: limiteerides sugurakkude populatsiooni tasemeni, mis vastab Sertoli rakkude arvule (Lee et al. 1997) ning kõrvaldades selektiivselt ebanormaalseid seemnerakke (Irvine et al. 2000). Siiski eksisteerib küsimus, kas defektne apoptoos võib olla üheks põhjuseks, miks viljatutel meestel esineb märkimisväärselt DNA katketega seemnerakke.

Uuringud on näidanud, et munarakud ning varajases arengustaadiumis olevad embrüod on võimelised parandama seemnerakkude DNA katkeid (Genesca et al. 1992). Samas sõltub seemnerakkude kromatiini kahjustuste bioloogiline efekt kahjustuste ulatusest ning munaraku võimest parandada kromatiini kahjustusi (Ahmadi and Ng 1999). Seetõttu, juhul kui lastetuse ravis kasutatakse DNA kahjustustega seemnerakke, võib tulemuseks olla *in vitro* embrüote madal arengu- ja/või implanteerumisvõime (Ahmadi and Ng 1999).

### **1.4.3. Seemnerakkude DNA metüleeritus**

Lisaks nukleotiidsele järjestusele mõjutab geenide aktiivsust ka epigeneetiline regulatsioon. DNA epigeneetiline regulatsioon hõlmab mitmeid erinevaid mehhanisme nagu: DNA metülatsiooni ja demetülatsiooni; RNA (*Ribonucleic acid*) vaigistamist ja histoonide kovalentset modifitseerimist. Kõiki nimetatud regulatsioonivõimalusi kasutatakse aktiivselt geeniekspressiooni regulatsioonis. Epigeneetilised muutused lubavad rakkudel reageerida keskkonnast tulenevatele faktoritele muutes geeni ekspressiooni taset ilma, et oleks vaja muuta DNA nukleotiidset järjestust.

Tsütosiini jääkide metüleerimine CpG dinukleotiidsetes järjestustes on osa keerulisest epigeneetilisest regulatsioonimehhanismist, mis võimaldab geenide aktiivsust nii aktiveerida (demetülatsioon) kui ka represserida (metülatsioon) (Jaenisch and Bird 2003). Lisaks omab DNA metülatsioon/demetülatsioon suurt tähtsust imprintsitud geenide aktiivsuse regulatsioonis ja X-kromosoomi inaktivatsioonis emaste imetajate somaatilistes rakkudes (Li et al. 1993). Samas kui diferentseerunud somaatilistes

rakkudes püsib rakkudele iseloomulik metülatsioonimuster suhteliselt muutumatuna, esineb organismi arengus vähemalt kaks kriitilist perioodi, millal toimub totaalne metülatsioonimustri reprogrammeerimine. Esimene selline reprogrammeerimise periood leiab aset gametogeneesi staadiumis ja teine periood toimub preimplantatiivses embrüos (Reik et al. 2001).

Gametogeneesi käigus toimuv reprogrammeerimine on hädavajalik imprintingu mehhanismide korrektseks toimimiseks. Imprinting on geeniaktiivsuse regulatsioonimehhanism, mis võimaldab isalt ja emalt päritud geenide erinevat ning stabiilset ekspressiooni. Imprintingu regulatsioonimuster seadistatakse uuesti soospetsiifiliselt sugurakkude eellasrakkudes (Razin and Cedar 1994).

Küpsed munarakud ja seemnerakud omavad küllaltki erinevat epigeneetilist mustrit. Munaraku DNA genoom on hüpometüleeritud, samas kui seemneraku DNA on pigem hüpermetüleeritud (Monk et al. 1987). Peale viljastumist, kui seemneraku ja munaraku genoomid moodustavad isapoolse ning emapoolse pronukleuse, vajab kõrgelt kondenseerunud seemneraku kromatiin, erinevalt munaraku kromatiinist, ulatuslikku reorganiseerumist. Isapoolse genoomi reorganiseerumise käigus asendatakse protamiinid histoonidega. Uuringutes, milles on kasutatud 5-metüültsütosiini vastaseid antikehi, on näidatud, et hiire, roti, sea ning inimese isapoolses pronukleuses toimub enne süngaamiat (ema- ning isapoolsete kromosoomide ühinemine) aktiivne DNA demetüleerimine. Samal ajal, kui emapoolse kromatiini demetülatsioon toimub inaktiivselt rakkude jagunemise käigus (Mayer et al. 2000). Embrüo preimplantatiivse arengu jooksul embrüo rakkudes toimuvad demetülatsiooni protsessid (isapoolse kromatiini aktiivne e. ensümaatiline demetüleerimine ja emapoolse kromatiini inaktiivne demetüleerimine) lõpevad moorula staadiumiks (Mayer et al. 2000). Seetõttu on enne implantatsiooni embrüo genoom suhteliselt hüpometüleeritud. Embrüo pesastumise e. implanteerumise järgselt leiab aset aga embrüo rakkude DNA *de novo* metülatsioon, mis vastab areneva embrüo vajadustele (Reik et al. 2001).

Uuringud on viidanud võimalustele, et seemnerakkude ja munarakkude DNA metüleerituse tase võib mõjutada embrüo arengupotentsiaali (Mayer et al. 2000). Samuti on teada, et embrüo rakkude metülatsioonimustrite rikkumine mõjub imetajate



embrüotele letaalselt (Li et al. 1992). Seetõttu on väga tõenäoline, et kõrvalekalded gameetide (munarakkude ja seemnerakkude) metülatsioonimustris võivad põhjustada varajase embrüo arengu ja implantatsiooni häireid.

### **1.5. Munarakk**

Munarakk on suhteliselt suur, *ca* 100 µm läbimõõduga rakk. Munarakku ümbritsevad *zona pellucida* ja follikulaarsed rakud (*corona radiata*). Follikulaarsed rakud ümbritsevad küpsevat munarakku nii kasvavas folliikulis kui ka tema liikumisel munajuhas, olles samuti vastutatavad seemneraku ja munaraku interaktsioonide eest. Follikulaarsed rakud "valivad välja" viljastamisvõimeliste seemnerakkude populatsiooni, mistõttu ainult väikene osa seemnerakke suudab tungida läbi follikulaarsete rakkude kihi ja jõuda munarakuni. Follikulaarsete rakkude all paikneb glükoproteiine sisaldav kest - *zona pellucida*. *Zona pellucida* on 5 - 15 µm paksune munarakku ümbritsev kest, mis koosneb kolmest glükoproteiinist ZP1, ZP2 ja ZP3. Kirjanduse andmetel omab seemnerakuga seostumisel kõige suuremat tähtsust ZP3 valk (Gilbert 1994). *Zona pellucida* kaitseb ja ümbritseb munarakku nii küpsemise ajal kui ka hiljem varajase embrüogeneesi perioodil. Samuti tagab *zona pellucida* seemneraku liigispetsiifilise seostumise ning on peamiseks polüspermia takistajaks. Vahetult munaraku plasmamembraani all paiknevad ensüüme sisaldavad kortikaalsed graanulid. Erinevalt seemnerakkudest, algab meioos munarakkudes juba embrüonaalselt, kuid peatub meioosi esimese jagunemise profaasi staadiumis (Gilbert 1994).

## 1.6. Viljastumine

Viljastumine on protsess, milles osalevad kaks haploidset gameeti ning mille tulemusena tekib diploidne viljastunud munarakk e. sügoot.

### 1.6.1. Seemneraku adaptatsioon

Viljastumine toimub munajuhas, kus viljastamisvõimelisteks saanud seemnerakke ootab küps munarakk. Seemnerakud peavad viljastamisvõimeliseks saamiseks küpsema munandimanuses ning läbi tegema kohanemise e. kapatsitatsiooni emasorganismi suguteedes (Gilbert 1994). Inimese puhul võtab kapatsitatsioon aega 5 - 6 tundi ning nimetatud rakufüsioloogilist muutust indutseerivad tupesekreedis esinevad bikarbonaatioonid ( $\text{HCO}_3^-$ ), mis sisenevad seemnerakku ja aktiveerivad adenülüül tsüklaasi (Visconti et al. 1995). Nimetatud ensüüm toodab tsüklilist AMP-d (*Cyclic Adenosin Mono-Phosphate*), mis aitab käivitada kohanemisega seotud muutuseid. Kapatsitatsioon muudab valkude ja glükoproteiinide vahekorda seemneraku plasmamembraanis ning kiirendab seemneraku metabolismi ja liikuvust. Samas muutub märkimisväärselt ka seemneraku membraanipotentsiaal - membraan hüperpolariseerub ja muutub negatiivsemaks. Eksponeeruvad ka seemneraku plasmamembraanil asetsevad liigispetsiifilised adhesioonimolekulid, näiteks *zonadhesin* (Alberts et al. 2002). *Zonadhesin* on seemneraku akrosomaalses regioonis ekspresseeruv multidomääne molekul, mis omab ka mutsiinilaadset domääni ning vastutab seemneraku liigispetsiifilise seondumise eest munaraku *zona pellucida*-le (Hardy and Garbers 1995).

### 1.6.2. Seemneraku seondumine munarakule

Viljastumisel on olulisteks etappideks munaraku äratundmine seemneraku poolt; seemneraku seondumine *zona pellucida*-le; munaraku kesta poolt indutseeritud seemneraku akrosoomi reaktsioon; seemneraku penetreerumine läbi munaraku kesta ning seemneraku ja munaraku geneetilise materjali segunemine (Wassarman 1999). Seemneraku seondumine munaraku kestale on liigispetsiifiliste glükoproteiinide poolt vahendatud protsess. Spermi eesosa plasmamembraanil asetsevad retseptoritena

erinevad adhesioonivalgud nagu glükosüültransferaasid, glükosidaasid ning lektiinid. Nimetatud adhesioonivalgud tunnevad ära vaid sama liigi munaraku *zona pellucida*-l esinevaid komplementaarseid glükoproteiinseid ligande (Tulsiani and Abou-Haila 2001). Varasemad uuringud on näidanud, et *zona pellucida* laseb selektiivselt seonduda vaid morfoloogiliselt normaalsetel seemnerakkudel ning oluliseks on just seemneraku kuju ja akrosoomipiirkonna morfoloogia (Garrett et al. 1997). Morfoloogiliselt ebanormaalsed seemnerakud, millel puudub akrosoom, ei ole võimelised *zona pellucida*-le seonduma (Bourne et al. 1995). Seetõttu on alust uskuda, et seemneraku akrosoomi regioon on üheks olulisemaks piirkonnaks seemnerakkude morfoloogia hindamisel ning seemnerakk vajab normaalset akrosoomi munaraku kestaga seandumiseks (Menkveld et al. 1996). Seemneraku kinnitumisel munarakule indutseerib *zona pellucida* ZP3 glükoproteiin seemneraku akrosoomi reaktsiooni (Leyton and Saling 1989).

### **1.6.3. Akrosoomi reaktsioon ja munaraku plasmamembraani läbimine**

Akrosoomi reaktsiooni toimumine korreleerub seemnerakkude võimega läbida *zona pellucida in vitro* tingimustes (Liu and Baker 1994). Uuringutes on näidatud, et 25 - 30 %-l viljatutel meestel, kelle spermide parameetrid on olnud korras, esineb akrosoomi reaktsiooni häireid (Liu and Baker 1994). Akrosoomi reaktsiooni indutseerivad ZP3-ga seandumisel avanenud  $Ca^{2+}$  kanalid, mille kaudu sisenevad  $Ca^{2+}$  seemneraku tsütoplasmasse.  $Ca^{2+}$  ionide sisenemine omakorda käivitab akrosoomis asetsevate lüsoosomaalsete ensüümide eksotsütoosi (Florman et al. 1998). Tänu seemneraku suurenenud liikumisvõimele ja akrosoomist vabanenud hüdrofüütilistele ensüümidele jõuab seemnerakk munaraku plasmamembraanini, seemneraku ja munaraku plasmamembraanid ühinevad ning seejärel liigub seemnerakk munaraku tsütoplasmasse (Gundersen 1986).

### **1.6.4. Kiire ja aeglane blokk tõkestamiseks polüspermiat**

Seemneraku sisenemine munarakku põhjustab kiiret  $Ca^{2+}$  ionide kontsentratsiooni tõusu munaraku tsütoplasmas, mille tulemusel muutub väga kiiresti munaraku membraanipotentsiaal. Viljastamata munaraku membraanipotentsiaal on -70 mV. Peale esimese seemneraku sisenemist, muutub munaraku membraanipotentsiaal

kiiresti positiivseks (+20 mV). Tegemist on kiire rakufüsioloogilise muutusega, mille eesmärgiks on välistada polüspermset viljastumist e. mitme seemneraku sisenemist munarakku. Selline polüspermia teket välistav muutus kestab siiski vaid väga lühikest aega – maksimaalselt ühe minuti. Nimetatud muutus on aga piisav, et käivitada järgmised polüspermia teket takistavad protsessid, mille käigus formeeruvad munarakku kaitsvad mehhaanilised barjäärid. Polüspermset viljastumist takistav mehhaaniline barjäär tekib, kui munaraku kortikaalsed graanulid (sisaldavad erinevaid ensüüme) eksotsüteeritakse munaraku ja *zona pellucida* vahele. Vabanenud ensüümid modifitseerivad *zona pellucida* ZP3 ja ZP2 glükoproteiine, mistõttu ei saa enam teised seemnerakud seostuda ega siseneda munarakku. Nimetatud kortikaalne reaktsioon on imetajatel peamine polüspermia tõkestav mehhanism (Gilbert 1994).

### **1.6.5. Viljastunud munarakk ehk sügoot**

Seemneraku sisenemise järgselt lõpetab munarakk meioosi teise jagunemise ja moodustub emapoolne pronukleus. Seemneraku tuum decondenseerub ja moodustub isapoolne pronukleus. Seejärel pronukleused lähenevad, nende tuumakatted seonduvad ning DNA ja tsentrosoom replitseeruvad. DNA ja tsentrosoomi replitseerumise järel tuumamembraan laguneb ning kromatiin kondenseerub. Mitoosi esimese jagunemise metafaasi staadiumis kogunevad seemneraku ja munaraku kromosoomid ühisele metafaasiplaadile, misjärel algab sügooti lõigustumine (Gilbert 1994).

## **1.7. Mehepoolset viljatust põhjustavad tegurid**

### **1.7.1. Testikulaarsed probleemid**

Mehepoolset viljatust võivad tihti põhjustada testikulaarsed probleemid, milledeks on erinevad kõrvalekalded normozoospermias (vt. Tabel 1., lk. 10) (WHO 2000). Seemnerakkude kontsentratsioon, nende liikuvus ja morfoloogia on mehe viljakuse seisukohalt väga olulised, mistõttu nimetatud parameetrite kõrvalekalded võivad olla sageli viljatuse põhjuseks. Seksuaalvahekorra ajal tuppe ejakuleeritud 300-st miljonist seemnerakust, jõuab viljastumispaigani munajuhasse ainult 200 seemnerakku (Alberts et al. 2002), mistõttu on oligozoospermia (seemnerakkude kontsentratsiooni langus) korral probleemiks, et munajuhasse ei jõua piisavalt seemnerakke.

Kuigi seminaalplasma on väga suure puhverduisvõimega, suudab see neutraliseerida tupe happelist keskkonda vaid suhteliselt lühikest aega. Seemnerakud peavad viljastumise korral jõudma emakakaela piirkonda 15 - 20 minuti jooksul pärast ejakulatsiooni. Tupes inaktiveeritakse seemnerakud kiiresti - ligikaudu pooleks tunniks tupe happelisse keskkonda jäänud seemnerakud ei ole enam võimelised munarakku viljastama (Mortimer 1994).

### **1.7.2. Krüptorhism**

Oluliseks viljatuse põhjuseks on ka munandite laskumise häired. e. krüptorhism. Krüptorhism on haiguslik seisund, mille korral munandid ei ole vastündinud poisil laskunud skrootumisse. Imetajatel, kellede munandid paiknevad munandikotis on selline munandite paiknemine vajalik nende normaalseks funktsioneerimiseks. Munandite laskumise probleem põhjustab spermatogeneesi häire, mis on tingitud testikulaarse metabolismi kõrvalekalletest (Gilbert 1994). Munandite normaalseks funktsioneerimiseks peab nende temperatuur olema 4 – 7°C alla kehatemperatuuri. Arvatakse, et munandite liikumist kõhuõõnest munandikotti reguleerivad androgeenid (Gilbert 1994). Ligikaudu 20 % ühepoolse e. unilateraalse krüptorhismiga poistest puutub hilisemas elus kokku viljatuse probleemiga. Vastav näitaja tõuseb aga kuni 70 %-ni kahepoolse e. bilateraalse krüptorhismi korral. Kahepoolset krüptorhismi esineb 25 % krüptorhismi juhtudel, mis moodustab umbes 0.8 % kõikidest vastündinud poistest (Cortes 1998).

### **1.7.3. Seemnerakkude vastased antikehad**

Seemnerakkude vastaseid antikehi esineb nii viljakatel kui ka viljatutel meestel. Ligikaudu 10 %-l viljatutel meestel esinevad seemnerakkude vastased autoantikehad kas vereplasmas või seminaalplasmas (Lenzi et al. 1997). Normaalses olukorras on seemnetorukestes arenevad seemnerakud testikulaarse barjääri tõttu eraldatud seemnetorukesi ümbritsevatest veresoontest. Nimetatud barjäär täidab kahte tähtsat funktsiooni. Esiteks takistab testikulaarne barjäär intratubulaarsetel spermatoosoididel lekkida vereringesse. Selle takistamine on oluline, kuna mehe immuunsüsteem ei ole võimeline ära tundma seemnerakkude antigene ja seetõttu võivad vereringesse

liikunud seemnerakud esile kutsuda mehel immuunvastuse. Immuunvastus väljendub seemnerakkude vastaste autoantikehade tekkimisena ja raskematel juhtudel isegi autoimmuunse reaktsioonina testistes. Mõlemal juhul võivad patoloogilised protsessid põhjustada mehepoolset viljatust. Teiseks erineb seemnetorukeste sees olev keskkond märkimisväärselt väljaspool seemnetorukest esinevast keskkonnast, mistõttu tagab testikulaarne barjäär spermatogeneesiks sobiva keskkonna püsimise (Johnson 2000).

Arvatakse, et naise rasestumise tõenäosus väheneb ligikaudu 20 % kui mehel esinevad seemnerakkude vastased autoantikehad (ESHRE 1998). Juhul, kui > 50 % seemnerakkudest on antikehadega seotud, langeb seemnerakkude viljastamisvõime juba märkimisväärselt (ESHRE 1998). Tõsise mehepoolse immunoloogilistest faktoritest tingitud viljatuse korral (> 80 % seemnerakkudest antikehadega seotud) võib abi olla üksnes ICSI-protseduuri kasutamisest (ESHRE 1998).

#### **1.7.4. Geneetilised defektid**

Geneetilised defektid võivad olla küllaltki sageli mehepoolse viljatuse põhjuseks. Uuringud näitavad, et viljatutel meestel esineb tavapärasest sagedamini kromosoomide arvu ja struktuuri anomaaliaid kui üldpopulatsioonis (ESHRE 1998). Viljatute meeste tsütogeneetilised uuringud on näidanud, et antud populatsioonis esineb 50 korda sagedamini 47,XXY karüotüüpi, 4 korda sagedamini 47,XYY karüotüüpi, 20 korda sagedamini 46,X,derY karüotüüpi, 8.5 korda sagedamini Robertsoni translokatsioone, 5 korda sagedamini retsiprookseid translokatsioone, 8 korda sagedamini inversioone ning 3 korda sagedamini marker kromosoomide (ESHRE 1998). Enamik sugukromosoomide hälbeid leiti meestelt, kelle ejakulaadis puudusid seemnerakud (azoospermised mehed) (Van Assche et al. 1996). Lisaks võivad mehepoolset viljatust põhjustada X-kromosoomi liiteliste geenide mutatsioonid (androgeeni retseptori geeni mutatsioonid) ning autosoomsetes kromosoomides esinevate geenide mutatsioonid (näiteks tsüstilist fibroosi põhjustava CFTR geeni mutatsioonid) (Mak and Jarvi 1996). Samuti võivad mehepoolset viljatust põhjustada mitokondriaalse DNA deletsioonid (Kao et al. 1998).

### 1.7.5. Reaktiivsete hapniku ühendite produktsioon spermas

Leukotsüüdid on organismi kaitsefunktsiooni tagavad vererakud, mis jaotatakse kolme klassi: granulotsüüdid (neutrofiilid, basofiilid, eosinofiilid), monotsüüdid ning lümfotsüüdid. Leukotsüütidest esinevad seemnevedelikus peamiselt neutrofiilid, monotsüüdid ja lümfotsüüdid. Lümfotsüüdid on põhiliselt pärit testisest ja munandimanusest, neutrofiilid ja monotsüüdid aga eesnäärmest. Neutrofiilid ja monotsüüdid on fagotsütoosivõimelised rakud, mis võivad osaleda ka anormaalsete spermatoosidide kõrvaldamisel (Sutovsky et al. 2003). Leukotsüüte aktiveerivad erinevad stiimulid, kuid peamiseks aktiveerijaks on suguteede põletikud (Agarwal et al. 2003). Seemnevedelikus esinevad leukotsüüdid kahjustavad seemnerakke, produtseerides hapniku radikaale ja erinevaid põletiku mediaatoreid (Aitken et al. 1992). Seemnerakud on oksüdatiivsetele kahjustustele eriti vastuvõtlikud, kuna seemnerakkude antioksidantide rikas tsütoplasma on küpsemise käigus eemaldatud ning nende plasmamembraan on tänu kõrgele polüküllastamata rasvhapete koostisele kergesti haavatav (Lenzi et al. 1996). Seega on reaktiivsete hapniku ühendite produktsioon testistes ning epididüümises seemnerakkudele eriti ohtlik. Peale ejakulatsiooni kaitseb seemnerakke oksüdatiivsete kahjustuste eest seminaalplasma, mis sisaldab erinevaid antioksidatiivseid ensüüme nagu superoksiidi dismutaas, katalaas ning glutatiooni peroksüdaas (Ochsendorf 1999). Superoksiidi dismutaas konverteerib superoksiid anioon-radikaali vähem toksilisteks produktideks ( $H_2O_2$ -ks ja  $O_2$ -ks). Katalaas ja glutatiooni peroksüdaas on aga ensüümid, mis katalüüsivad  $H_2O_2$ -e degradeerumist  $H_2O$ -ks ning  $O_2$ -ks.

Leukotsüütide kõrge kontsentratsioon spermas on suguteede põletiku näitajaks. Kokkuleppeliselt on patoloogiliseks normpiiriks leukotsüütide kontsentratsioon  $> 1 \times 10^6/ml$ , mille korral vajab patsient ravi (WHO, 2000). Samas on uuringutes leitud, et juba leukotsüütide kontsentratsiooni  $\geq 0.2 \times 10^6/ml$  korral on suurenenud mikroorganismide esinemissagedus. Seetõttu võiks leukotsüütide kontsentratsiooni  $\geq 0.2 \times 10^6/ml$  korral pöörata suuremat tähelepanu võimalikule põletikule (Punab et al., 2003). Lisaks on tähtis, et kõrgenenud leukotsüütide kontsentratsiooni seostatakse seemnerakkude halvema kvaliteediga (WHO, 2000). Leukotsüütide kontsentratsioon seemnevedelikus  $> 2 \times 10^6/ml$  vähendab seemnerakkude liikuvust (Chan et al. 1994)

ning samuti on uuringud näidanud negatiivset seost kehavälise viljastamise rasedustulemustega (Sharma et al. 1999).

Leukotsüüte detekteeritakse valgusmikroskoopia abil. Siiski on otsene ümarrakkude loendamine küllaltki ebatäpne, kuna värvimata leukotsüüte pole võimalik ebaküpssetest seemnerakkudest eristada. Seetõttu soovitab WHO kasutada peroksüdaasi testi, mille abil värvuvad leukotsüüdid pruuniks ja on ebaküpssetest seemnerakkudest eristatavad (WHO 2000). Samas näitas Endtz juba 1974. aastal, et kasutades peroksüdaasi testi on võimalik tuvastada vaid granulotsüüte ja mitte teisi leukotsüütide klasse (Endtz 1974). Seemnevedelikus esinevaid leukotsüüte on edukalt võimalik detekteerida läbivoolu tsütomeetria abil. Leukotsüütide detekteerimiseks kasutatakse peamiselt leukotsüütide antigeenide vastaseid monoklonaalseid antikehi (näiteks anti-CD45 ja anti-CD53), mis tunnevad ära kõiki polümorfonukleaarseid leukotsüüte (Ricci et al. 2000).

#### **1.7.6. Muud põhjused**

Lisaks eelnimetatud probleemidele on mehepoolse viljatuse kujunemisel tähtsad ka mitmed psüühilised ja/või sotsiaalsed probleemid, nagu erektsiooni ja ejakulatsiooni häired (Lambrea et al. 2006). Samuti võivad viljatust põhjustada endokriinsed häired (näiteks FSH ja androgeenide sünteesi ja sekretsiooni häired), operatsioonid, varikotseele e. munandikoti veenide laienemine ja traumad. Elustiili faktoritest on aga olulised rohke tubaka ja alkoholi tarbimine, keskkonna saastatus ning stressirohke eluviis.

#### **1.8. Viljatuse ravi võimalused**

Viljatuse ravis on tänapäeval kasutusel mitmeid erinevaid protseduure ning valik nende vahel sõltub ennekõike paari viljatuse põhjustest. Kõige sagedamini kasutatakse viljatuse ravis kehavälis viljastamist e. IVF-protseduuri. IVF-protseduuril viljastatakse munarakud seemnerakkudega katseklaasis e. *in vitro* tingimustes ja viljastunud munarakud arenevad inkubaatoris 1-5 päeva. Tavapäraselt valitakse emakasse siirdamiseks välja 2 embrüot. Siirdamisest üle jäänud embrüod



külmutatakse ning siiratakse emakasse IVF-protseduuri ebaõnnestumisel. IVF-protseduur koosneb kolmest etapist – I.) ettevalmistavast raviestapist (munasarjade hormonaalne stimulatsioon), II.) munasarjade punktsioonist ja munarakkude viljastamisest ning III.) embrüote kasvatamisest ning siirdamisest.

IVF-protseduuri ettevalmistava raviestapi eesmärgiks on paljude munarakkude üheaegse arengu stimuleerimine e. kontrollitud superovulatsioon. Tänapäeval kasutatakse munarakkude arengu stimuleerimisel gonadotropiini riliisinghormooni (*GnRH* e. *Gonadotropin Releasing Hormone*) analooge või antagoniste koos folliikuleid stimuleeriva hormooniga (FSH). Munarakkude lõplik küpsemine toimub tänu kooriongonadotropiinile (*hCG* e. *Human Chorionic Gonadotropin*).

Munasarjade punktsioonil eraldatakse ultraheli kontrolli all nõela abil folliikulitest munarakud. Seemnevedelik valmistatakse ette tsentrifuugimise teel, mille käigus eraldatakse kõige viljastamisvõimelisemad seemnerakud. Munarakkude viljastamisel segatakse sugurakud katseklaasis ja viljastumist kontrollitakse 16-18 tunni möödudes. Mehepoolse viljatuse korral (seemnerakke on vähe või esineb nende liikuvuse või morfoloogia häireid) saab seemneraku süstida otse munaraku tsütoplasmasse. Sellist mikromanipulatiivset protseduuri nimetatakse seemneraku intratsütoplasmaatiliseks injektsiooniks e. ICSI-ks (Palermo et al. 1992). Keskmiselt viljastub IVF-/ICSI-protseduuril 70 % munarakkudest.

Viljastunud munarakke kasvatatakse inkubaatoris maksimaalselt 5 päeva ning seejärel valitakse emakasse siirdamiseks 2 embrüot. Tavapärast toimub embrüote siirdamine 2. või 3. päeval pärast munarakkude viljastamist. Embrüote mikroskoopiline hindamine on kõige lihtsam, ohutum ning odavam võimalus embrüote arenemisvõime analüüsil. Peamised kriteeriumid mille alusel toimub embrüote selektsioon on embrüo morfoloogia ning embrüo rakkude e. blastomeeride jagunemise kiirus. Embrüote siirdamise järgselt alustab naine rasedust säilitavat ravi, mis vältab kaheksanda rasedusnädalani. Järgnevalt viiakse läbi rasedustest ja ultraheliuuring.

Paari lastetuse raviskeemi koostamisel omavad suurt tähtsust seemnerakkude analüüsi tulemused. ICSI-protseduuri tuleb kasutada juhul, kui seemnerakkude kontsentratsioon spermas on  $< 20 \times 10^6$  seemneraku 1 ml spermas või kui spermas esineb  $< 3$  % normaalse morfoloogiaga seemnerakke (Trounson 1993).

### **1.8.1. Viljatusravi tulemuslikkust mõjutavad tegurid**

Keskmiselt rasestub kehavälise viljastamise protseduuri tulemusena 25 – 30 % naistest. Kuna emakasse siiratakse tavapäraselt vähemalt kaks embrüot, siis on ligikaudu 25 % IVF-rasedustest mitmikrasedused (ESHRE 2006). IVF-protseduuri tulemuslikkus sõltub kõige rohkem naise vanusest. Naise vananedes esineb temal sagedamini aneuploidseid munarakke, milledest arenenud embrüod ei implanteeru (Dailey et al. 1996). Lisaks sõltub lastetuse raviprotseduuri tulemuslikkus emakasse siiratud embrüote morfoloogilisest kvaliteedist ning paari viljatuse põhjustest. Uuringud on siiski näidanud, et IVF- ning ICSI-protseduuri rasedustulemused on sarnased (ESHRE 2006).

### **1.8.2. Seemnerakkude kvaliteedi hindamine läbivoolu tsütomeetria abil ning viljatusravi tulemuslikkus**

Käesoleval hetkel kasutatakse lastetuse ravi tulemuslikkuse prognoosimisel kõige sagedamini Evenson *et al.* poolt 1980. aastal välja töötatud SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) meetodit (Evenson et al. 1980). Antud meetod võimaldab hinnata seemnerakkude kromatiini intaktsust, võimaldades analüüsida nii seemnerakkude muutunud DNA ja protamiinide interaktsioonidest tulenevat suurenenud DNA värvumust e. HDS-i (*High DNA Stainability*), kui ka seemnerakkude populatsioonis esinevate fragmenteerunud DNA-ga seemnerakkude osakaalu e. DFI-d (*DNA Fragmentation Index*) (Evenson et al. 1999). Suurenenud seemnerakkude DNA värvumuse korral (HDS > 10 %) ning fragmenteerunud DNA-ga seemnerakkude suurenenud osatähtsuse korral (DFI > 30 %) on täheldatud rasestumise tõenäosuse vähenemist *in vivo* ja kehavälise viljastamise protseduurides (IVF- ja ICSI-protseduurid) kui ka raseduste iseenesliku katkemise tõenäosuse suurenemist (Evenson and Wixon 2006). Metaanalüüs on näidanud, et kasutades seemnerakkude intrauteriinset inseminatsiooni (kergema mehepoolse viljatuse korral kasutatav lastetuse raviprotseduur) on naise rasestumise tõenäosus 7.3 korda suurem kui seemnerakkude DFI on < 30 % (Bungum et al. 2004). IVF-protseduuris, kui viljastamiseks kasutatavate seemnerakkude DFI väärtus on < 30 %, on naise rasestumise tõenäosus 2 korda suurem kui patsientidel kelle DFI on > 30 % (Bungum et al. 2004; Virro et al. 2004). ICSI-protseduurides on aga seemnerakkude DFI mõju

väiksem – rasestumise tõenäosus DFI < 30 % korral on 1.6 korda kõrgem kui DFI > 30 %, jäädes statistiliselt ebaoluliseks (Evenson and Wixon 2006). Siiski on küllaltki raske seletada, miks SCSA testi tulemused on suurema tähtsusega IVF-protseduuri kui ICSI-protseduuri korral.

Lisaks SCSA meetodile on kehavälise viljastamise tulemuste ennustamisel kasutatud ka seemnerakkude DNA metüleerituse uuringuid (Benchai et al. 2005). Benchai *et al.* (2005) poolt teostatud uuringus leiti, et seemnerakkude DNA metüleerituse taseme > 555 (suhtelist ühikut) korral oli patsientidel 4 korda suurem tõenäosus rasestuda kehavälise viljastamise protseduuri kasutamise tulemusena kui patsientidel kelle seemnerakkude DNA metülatsiooni tase oli < 555 (suhtelist ühikut) (Benchai et al. 2005). Siiski on antud valdkonnast veel väga vähe informatsiooni ja seetõttu on vajalik teostada täiendavaid uuringuid.

Seemnerakkude prognostiline viljastamisvõime määramine on oluline paari lastetuse raviskeemi koostamisel. Teades seemnerakkude viljastamisvõimet on võimalik patsiendil kasutada kas IVF-protseduuri või ICSI-protseduuri. ICSI-protseduuri kasutamine kõikidel viljatutel patsientidel ei ole aga mõeldav, kuna ICSI-protseduur on töömahukam ning võib olla seotud teatud meditsiiniliste komplikatsioonidega. Selleks, et vältida olukorda, et munarakud IVF-protseduuris ei viljastu, oleks vaja teada võimalikult täpselt seemnerakkude viljastamisvõimet *in vitro* olukorras. Seemnerakkude viljastamisvõime on küllaltki suurel määral determineeritud akrosoomi piirkonna kvaliteedi poolt. Seetõttu on mitmetes uurimistöödes kasutatud läbivoolu tsütomeetriat, et hinnata seemnerakkude akrosoomi piirkonna kvaliteeti ning antud näitaja seoseid munarakkude viljastumise tõenäosusega IVF-protseduuris (Carver-Ward et al. 1996; Rufas et al. 1998). Näiteks on seemnerakkude voolutsütomeetria uuringutes kasutatud FITC (*Fluoresceine Isothiocyanate*) konjugeeritud *Pisum Sativum* lektiini, mille abil tuvastati, et normozoospermsetel patsientidel, kelle seemnerakud ei viljastanud munarakke, oli probleeme akrosoomi reaktsiooni käivitamisega (Rufas et al. 1998). Samuti on akrosoomi reaktsiooni käivitumise efektiivsust hinnatud ka seemneraku akrosoomi piirkonna membraanis paikneva CD46 antigeeni vastast antikeha kasutades (Carver-Ward et al. 1996).

Sperma leukotsüütide määramisel voolutsütomeetria abil on kasutatud erinevaid monoklonaalseid antikehi - anti-CD45 ja anti-CD53 (Ricci et al. 2000) ning anti-CD16 (Moilanen et al. 1998). Ricci *et al.* (2000) näitas positiivse korrelatsiooni esinemist voolutsütomeetria ning mikroskoopia abil määratud sperma leukotsüütide kontsentratsiooni vahel (Ricci et al. 2000). Siiski puudub informatsioon sperma leukotsüütide kontsentratsiooni ning lastetuse raviprotseduuride (IVF- ja ICSI-protseduurid) tulemuslikkuse vahel esinevate seoste kohta.

Seemnerakkude voolutsütomeetria uuringuid on lisaks kasutatud ka ubikvitiiniga märgistatud (Ozanon et al. 2005) ning apoptoosiliste seemnerakkude (Marchetti et al. 2004) osakaalu tuvastamiseks spermas ja ka näiteks seemnerakkude mitokondrite membraanipotentsiaali uurimisel (Kasai et al. 2002).

## TÖÖ EESMÄRGID

Töö eesmärkideks oli kasutada voolutsütomeetrial põhinevaid seemnerakkude analüüsi meetodeid kehavälise viljastamise ravitulemuste prognoosimisel.

### **Töö konkreetsed eesmärgid olid järgnevad:**

*I.* Uurida voolutsütomeetrial põhineva ning seemneraku DNA intaktsust hindava SCSA testi tähtsust kehavälise viljastamise (IVF- ja ICSI-protseduurid) tulemuste (munarakkude viljastumine, *in vitro* embrüote kvaliteet ja patsientide rasestumine) prognoosimisel.

*II.* Uurida voolutsütomeetrial põhineva ning seemneraku DNA metülatsiooni hindava testi tähtsust kehavälise viljastumise (IVF- ja ICSI-protseduurid) tulemuste (munarakkude viljastumine, *in vitro* embrüote kvaliteet ja patsientide rasestumine) prognoosimisel.

*III.* Uurida voolutsütomeetrial põhineva ning seemneraku akrosoomi piirkonna kvaliteeti hindava testi tähtsust munarakkude viljastumisele IVF-protseduuris.

*IV.* Uurida voolutsütomeetrial põhineva ning sperma leukotsüütide kontsentratsiooni hindava testi tähtsust kehavälise viljastamise (IVF- ja ICSI-protseduurid) tulemuste (patsientide rasestumine) prognoosimisel.

## **EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Materjalid ja meetodid**

Uurimustöö teostati Nova Vita Kliiniku IVF- ja ICSI-protseduuride patsientide (n = 238) baasil, ajavahemikus 2.2005 – 4.2006. Uurimismaterjalina kasutati seemnerakke, mida ei kasutatud patsientide lastetuse ravis. Uuringus osalenud patsiente teavitati uuringu eesmärkidest ning nad allkirjastasid teadliku nõusoleku lehe.

Antud uuringu läbiviimiseks oli väljastatud Tervise Arengu Instituudi Tallinna Meditsiiniuuringute eetikakomitee luba nr. 631 (1.2.2005).

#### **2.1.1. Seemnevedeliku kogumine ja säilitamine**

Seemnevedeliku proovid anti masturbatsiooni teel steriilsesse nõusse. Viimasest seemnepurskest oli möödunud 2-7 päeva. Peale sperma proovi andmist fikseeriti ejakulaadi ruumala. Seejärel lasti spermal 30 minuti jooksul veelduda, samal ajal sperma proovi segades. Järgnevalt viidi läbi seemnerakkude kontsentratsiooni ja liikuvuse määramine. IVF- või ICSI-protseduuriks vajalik kogus seemnerakke valmistati ette vastavaid protokolle järgides. Seemnerakkude ettevalmistamisel kasutati seemnerakkude tsentrifuugimist Pure Sperm (MediCult, Taani) lahuse gradiendis. IVF- või ICSI-protseduuriks kasutati 1-2 ml spermat ning ettevalmistusest üle jäänud seemnerakke kasutati teaduslikes uuringutes. IVF- ja ICSI-protseduuridest üle jäänud seemnevedelik pipeteeriti krüotuubidesse (Nunc, Taani), märgistati ning säilitati vedela lämmastiku keskkonnas või -70°C juures.

#### **2.1.2. Seemnerakkude DNA analüüs SCSA meetodil**

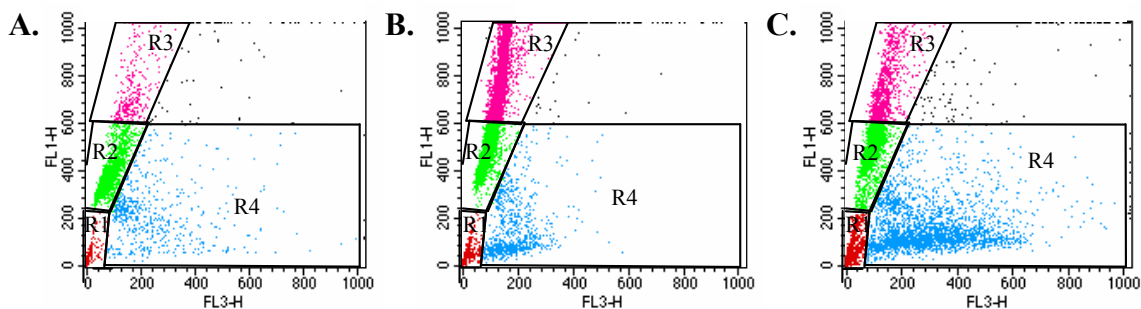
##### **2.1.2.1. Seemnerakkude ettevalmistus SCSA analüüsiks**

Hindamaks seemnerakkude DNA-kahjustuste ulatust, kasutati Evenson *et al.* poolt välja töötatud SCSA meetodit (Evenson et al. 1980). Selleks sulatati seemnerakkude proovid 2 minuti jooksul, kasutades 37°C vesitermostaati. Seejärel lahjendati seemnevedelik TNE puhvril [0.15 M NaCl (Sigma, Ameerika Ühendriigid); 0.01 M

Tris HCl (Merck, Saksamaa); 1 mM EDTA (Sigma, Ameerika Ühendriigid); lahuse pH 7.4] kontsentratsioonini  $2 \times 10^6$  spermi/ml. Seemnerakkude suspensioon (0.2 ml) segati 0.4 ml happe ja detergendi lahusega [0.08 M HCl (Merck, Saksamaa); 0.15 M NaCl; 0.1 % Triton X-100 (Sigma, Ameerika Ühendriigid); lahuse pH 1.2] ning 30 sekundit hiljem värviti rakud akridiin-oranži lahusega (1.2 ml) [0.037 M tsitraathape (Sigma, Ameerika Ühendriigid); 0.126 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, Ameerika Ühendriigid); 1.1 mM EDTA; 0.15 M NaCl; lahuse pH 6.0], mis sisaldas akridiin-oranži lõppkontsentratsiooniga 6µg/ml (Sigma, Ameerika Ühendriigid). Proove inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril ning seejärel analüüsiti proovid kasutades firma Becton Dickinson läbivoolu tsütomeetrit FACSCalibur ja sama firma tarkvara CellQuest (BD Biosciences, Ameerika Ühendriigid).

#### **2.1.2.2. SCSA meetod läbivoolu tsütomeetril**

Hindamaks seemnerakkude kromatiini terviklikkust, mis on SCSA-meetodi puhul defineeritud kui seemnerakkude DNA vastuvõtlikkus happe poolt indutseeritud denaturatsioonile *in situ*, kasutati akridiin-oranži metakromaatilisi omadusi fluorestseeruda punaselt (signaal FL3-H kanalis) seondudes dimeersena üheaahelalisele DNA-le ning fluorestseeruda roheliselt (signaal FL1-H kanalis) seondudes monomeersena kaheaahelalisele DNA-le. Ühe olulise näitajana antud analüüsis arvestatakse seemnerakkude DNA fragmentatsiooni indeksit ehk DFI-d, mis moodustub punase fluorestsentsiga rakkude suhtest kõikidesse rakkudesse (punase ja rohelise fluorestsentsiga rakkude summa). SCSA meetodi tulemuste analüüsil kasutati järgnevat jaotust:  $> 30\%$  DFI ja  $\leq 30\%$  DFI. Järjest olulisemaks näitajaks seemnerakkude kvaliteedi hindamisel SCSA-meetodiga on muutunud ka DNA-protamiinide interaktsioonidest tulenev suurenenud DNA värvumine e. HDS.



**Joonis 1.** Seemnerakkude analüüs SCSA meetodil. A.: HDS = 2.5 %; DFI = 4.6 %; B.: HDS = 25.7 %; DFI = 7.5 % ning C.: HDS = 9.5; DFI = 42.1 %. FL1-H teljel on kujutatud akridiin-oranži seondumine DNA-le monomeersena (roheline kanal) ja FL3-H teljel akridiin-oranži seondumine DNA-le dimeersena (punane kanal)

Joonisel 1. on toodud illustreerivad graafikud SCSA meetodil saadud tulemustest. Graafikul 1.A. on kujutatud patsiendi proov, kelle seemnerakkude HDS ja DFI väärtused olid madalad - HDS = 2.5 % ja DFI = 4.6 %. Graafikul 1.B. on kujutatud kõrge HDS-väärtusega patsiendi proov - HDS = 25.7 % ja DFI = 7.5 %. Graafikul 1.C. on kujutatud kõrge DFI-väärtusega patsiendi proov - HDS = 9.5 % ja DFI = 42.1 %.

### 2.1.3. Seemnerakkude DNA metüleerituse määramine

#### 2.1.3.1. Seemnerakkude ettevalmistus DNA metülatiooni uuringuks

Seemnerakud sulatati 2 minuti jooksul, kasutades 37°C vesitermostaati. Seejärel lisati sulatatud materjalile 3 ml PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Gibco, Ameerika Ühendriigid) - 0.1 % Tween-20 (Sigma, Ameerika Ühendriigid) lahust (edaspidi PBS-Tween). Seminaalplasmast vabanemiseks tsentrifugeeriti rakkude suspensiooni 10 minuti jooksul 400 g juures ning supernatant aspireeriti. Sade resuspendeeriti 0.2 ml PBS-is ning fikseeriti 1 ml jahutatud metanooliga (-20°C) (Fluka, Šveits), lisades tilkhaaval metanooli ning proovi pidevalt segades. Suspensiooni inkubeeriti jääl 30 minutit. Seejärel tsentrifugeeriti segu 10 minuti jooksul 400 g juures. Sade resuspendeeriti 100 µl 1 M Tris HCl lahuses (pH 9.5) (Merck, Saksamaa), mis sisaldas 25 mM ditiotreitooli (DTT; Sigma, Ameerika Ühendriigid) ning inkubeeriti

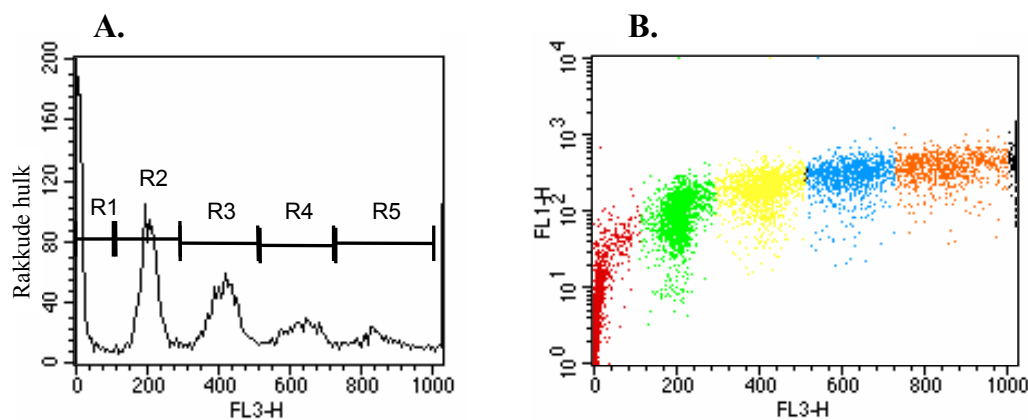


toatemperatuuril 20 minutit. Järgnevalt pesti rakke kaks korda, lisades 1 ml PBS-Tween lahust ning tsentrifugeerides segu 10 minuti jooksul 400 g juures. DNA denatureerimiseks resuspendeeriti sade 0.5 ml 4 M HCl-s (Fluka, Šveits) ning inkubeeriti toatemperatuuril 20 minutit. Lisati 5 ml PBS-i ning tsentrifugeeriti 10 minuti jooksul 400 g juures. Sade resuspendeeriti 0.5 ml Na-boraatpuhveris (pH 8.5) (Sigma, Ameerika Ühendriigid) ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Lisati 5 ml PBS-i ning tsentrifugeeriti 10 minuti jooksul 400 g juures. Blokeerimiseks resuspendeeriti sade 1 ml blokeerimislahuses [1 % BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Gibco, Ameerika Ühendriigid) PBS-is] ja inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Lisati 3 ml PBS-i ning tsentrifugeeriti 10 minuti jooksul 400 g juures. Seemnerakkude metülatsiooni hindamiseks suspendeeriti rakud 50 µl hiire valmistatud monoklonaalse antikeha 33D3 (Abcam Ltd, Inglismaa) lahuses (lahjendus blokeerimislahuses 1:200) ning inkubeeriti 30 minutit 37°C juures. Kasutatud antikeha epitoobiks on 5-metüültsütosiin. Negatiivse kontrollina kasutati antikeha pAb242 (lahjendus blokeerimislahuses 1:1000), mille epitop asub hiire p53-e N-terminaalses piirkonnas. Antud antikeha tootev hübridoomiliin saadi Dr. J.R Jenkinsilt. Seejärel pesti rakke kaks korda, lisades segule 3 ml PBS-i ning tsentrifugeerides 10 minuti jooksul 400 g juures. Sade resuspendeeriti 50 µl sekundaarse antikeha lahuses [FITC-konjugeeritud polüklooraalne küülikus valmistatud hiire IgG vastane antikeha (DakoCytomation, Taani) (lahjendus 1:50 blokeerimislahuses)] ja inkubeeriti 30 minutit 37°C juures. Järgnevalt lisati 3 ml PBS-i ning tsentrifugeeriti 10 minuti jooksul 400 g juures. Rakud resuspendeeriti 400 µl PBS-7AAD (*7-Aminoactinomycin D*; lõppkontsentratsioon 10 µg/ml) (Molecular Probes, Ameerika Ühendriigid) lahuses ja inkubeeriti 3 minutit jääl. Proovid analüüsiti kasutades läbivoolu tsütomeetrit.

### **2.1.3.2. Metüleerituse määramine läbivoolu tsütomeetril**

Seemnerakkude metülatsiooni hindamisel kasutati hiire valmistatud monoklonaalset 5-metüültsütosiini vastast antikeha 33D3. Sekundaarse antikehana kasutati FITC-ga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha (signaal FL1-H kanalis). Negatiivseks kontrolliks kasutati primaarset antikeha pAb242. Seemnerakkude hulga määramiseks proovides kasutati värvimist 7AAD-ga. 7AAD on punaselt fluorestseeruv DNA-ga

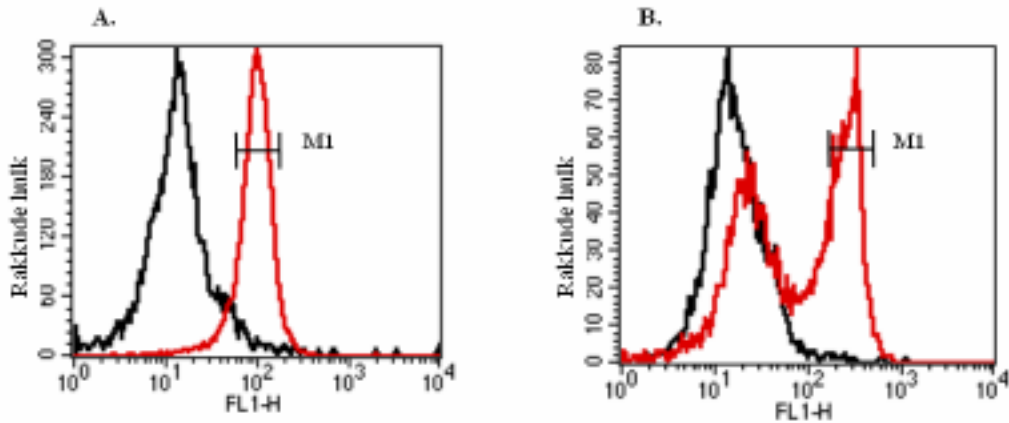
seonduv ühend (signaal kanalis FL3-H), mis võimaldab eristada haploidsete, diploidsete ning polüploidsete rakkude populatsioone (Joonis 2.).



Region	Tähistus dot-plotil	Regioonides sisalduv materjal
R1	Tumepunane	Katkised rakud
R2	Roheline	Haploidsed rakud
R3	Kollane	Diploidsed rakud
R4	Sinine	Polüploidsed rakud
R5	Punane	Rakkude agregaadid

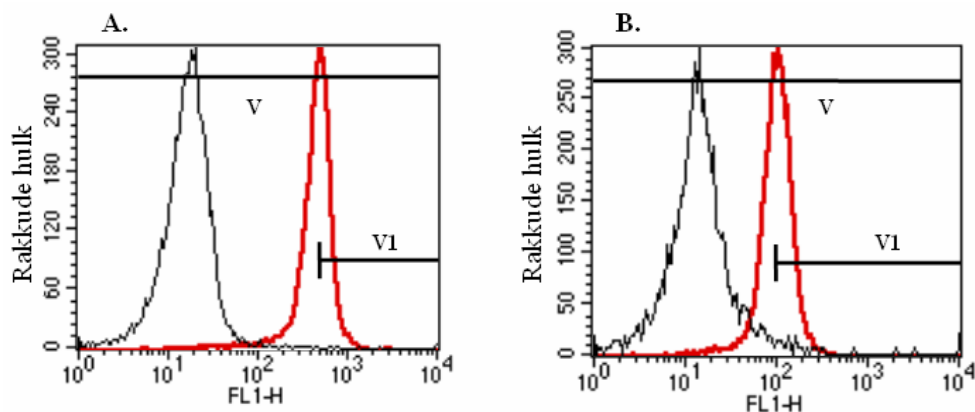
**Joonis 2.** 7AAD-ga värvimisel eristuvad erinevate ploidsustega rakkude populatsioonid

Seemnerakkude metülatsiooni homogeensuse analüüsimisel kasutati histogrammide märgistamist konstantse M1 väravaga (Joonis 3.). M1 värava suurus valiti proovide hulgast, kus 100 % munarakkudest olid viljastunud ning M1 väravasse lokaliseerus vähemalt 85 % antikeha 33D3 positiivseid haploidseid seemnerakke.



**Joonis 3.** Metüleeritud seemnerakkude märgistamine M1-värvaga. Musta joonega on histogrammidel kujutatud negatiivne seemnerakkude kontroll-populatsioon. Punase joonega on kujutatud aga antikeha 33D3 positiivne seemnerakkude populatsioon. Histogrammil 3. A. hõlmab M1-värvaga märgistatud ala 84.3 % seemnerakkude populatsioonist. Histogrammil 3. B. hõlmab M1 värvaga märgistatud ala 37.2 % seemnerakkude populatsioonist

Seemnerakkude metülatsiooni ulatuse mõju uurimisel kehavälise viljastamise protseduuri ravitulemustele, kasutati samuti seemnerakkude metülatsiooni indeksit –  $V1/V$ , mis näitab keskmisest rohkem metüleeritud seemnerakkude osatähtsust spermas.  $V1/V$  indeksis tähistab  $V1$  keskmisest rohkem metüleeritud seemnerakke ning  $V$  kõiki seemnerakke (Joonis 4).



**Joonis 4.** Seemnerakkude metülatsiooni indeksi V1/V defineerimine. Musta joonega on histogrammidel kujutatud negatiivne seemnerakkude kontroll-populatsioon. Punase joonega on kujutatud antikeha 33D3 positiivne seemnerakkude populatsioon. Histogrammil 4. A. on seemnerakkude metülatsiooni indeksi väärtuseks 0.28 ning histogrammil 4. B. on seemnerakkude metülatsiooni indeksi väärtuseks 0.42

#### 2.1.4. Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi hindamine

##### 2.1.4.1. Seemnerakkude ettevalmistus akrosoomi kvaliteedi hindamiseks

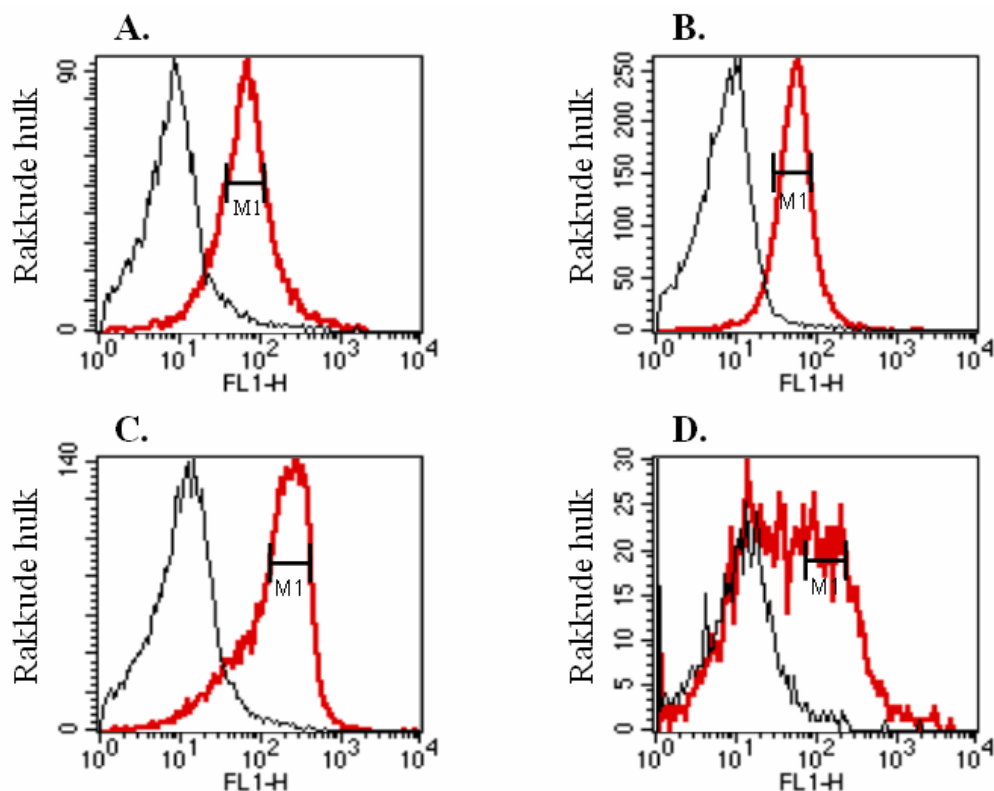
Seemnerakud sulatati 2 minuti jooksul, kasutades 37°C vesitermostaati. Seejärel lisati sulatatud materjalile 3 ml PBS - 0.1 % Tween-20 lahust (edaspidi PBS-Tween). Suspensiooni tsentrifuugiti 10 minuti jooksul 400 g juures ning supernatant aspireeriti. Sade resuspendeeriti 0.2 ml PBS-is ning fikseeriti 2 ml jahutatud metanooliga (-20°C) lisades metanooli tilkhaaval ning proovi pidevalt segades. Suspensiooni inkubeeriti 4°C juures 10 minutit. Seejärel lisati segule 2 ml PBS-Tween-i lahust ning tsentrifuugiti 10 minuti jooksul 400 g juures. Blokeerimiseks resuspendeeriti sade 500 µl blokeerimislahuses ja inkubeeriti segu toatemperatuuril 10 – 20 minutit. Järgnevalt lisati 2 ml PBS-Tween lahust ning tsentrifuugiti 10 minuti jooksul 400 g juures. Akrosoomi omavate seemnerakkude detekteerimiseks resuspendeeriti sade 500 µl akrosoomi pinnaantigeene detekteerivas hiire valmistatud inimese *zonadhesin*-i vastase monoklonaalse antikeha 9H8 hübridoomi supernatandis (Sikut et al. 1992) ning inkubeeriti 37°C juures 30 minutit. Negatiivse kontrollina kasutati antikeha pAb242 (lahjendus 1:1000). Seejärel pesti rakke kaks korda, lisades suspensioonile 3 ml PBS-Tween lahust ning tsentrifuugides 10 minuti jooksul 400 g juures. Sade resuspendeeriti 100 µl sekundaarse antikeha lahuses

[FITC-konjugeeritud küülikus valmistatud hiire IgG vastane antikeha (DakoCytomation, Taani) (lahjendus blokeerimislahuses 1:50)], millele oli lisatud Rnaas-i (Sigma, Ameerika Ühendriigid) (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Segu inkubeeriti 30 minutit 37°C juures. Järgnevalt lisati 3 ml PBS-Tween lahust ning tsentrifugeeriti 10 minuti jooksul 400 g juures. Rakud resuspendeeriti 400 µl PBS-7AAD (lõppkontsentratsioon 10 µg/ml) lahuses ja inkubeeriti 3 minutit jääl. Proovid analüüsiti kasutades läbivoolu tsütomeetrit.

#### **2.1.4.2. Akrosoomi kvaliteedi hindamine läbivoolu tsütomeetril**

IVF-protseduuride korral on oluline seemnerakkude akrosoomi piirkonna kvaliteet. Käesolevas töös kasutati seemnerakkude akrosoomi piirkonna kvaliteedi hindamisel hiires valmistatud monoklonaalset antikeha 9H8, mille epitoobiks seemnerakkudel on suure tõenäosusega akrosoomaalses regioonis leiduva *zonadhesin*-i glükoproteiini mutsiinilaadsed domäänid (Sikut et al. 1992). 9H8 on seemnerakkude vastase monoklonaalse antikehana leidnud heakskiidu WHO poolt (WHO kood nr. S80) (WHO 1992). Sekundaarse antikehana kasutati FITC-ga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha. Negatiivse kontrollina kasutati primaarset antikeha pAb242. Seemnerakkude defineerimiseks värviti rakud 7AAD-ga.

Antikeha 9H8 positiivsete e. akrosoom-positiivsete seemnerakkude defineerimisel kasutati histogrammide märgistamist M1 väravaga (Joonis 5.), mis oli kõikide analüüsitud proovide korral konstantse suurusega. M1 värava suurus valiti sperma proovide hulgast, kus 100 % munarakkudest olid viljastunud ning M1 väravasse jäi vähemalt 70 % haploidsetest seemnerakkudest.



**Joonis 5.** Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi hindamine M1 värava abil. Graafikutel 5. A. ja B. on esitatud seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi suhtes homogeensete spermidega patsiendid (M1 väravas vastavalt 60 % ja 76.5 % seemnerakkudest). Graafikutel 5. C. ja D. on esitatud seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi suhtes heterogeensete spermidega patsiendid (M1 väravas vastavalt 57 % ja 25.4 % seemnerakkudest)

## 2.1.5. Sperma leukotsüütide detekteerimine

### 2.1.5.1. Sperma leukotsüütide ettevalmistus läbivoolu tsütomeetria uuringuks

Sperma sulatati 2 minuti jooksul, kasutades 37°C vesitermostaati. Seejärel lisati sulatatud rakkudele 3 ml PBS-Tween lahust ning suspensiooni tsentrifugeeriti 10 minuti jooksul 400 g juures. Järgnevalt supernatant aspireeriti ja sade resuspendeeriti 0.2 ml PBS-is. Rakud fikseeriti 2 ml jahutatud metanooliga (-20°C) lisades metanooli tilkhaaval proovi pidevalt segades. Suspensiooni inkubeeriti 4°C juures 10 minutit. Seejärel lisati segule 2 ml PBS-Tween lahust ning tsentrifugeeriti 10 minuti jooksul 400 g juures. Blokeerimiseks resuspendeeriti sade 500 µl blokeerimislahuses ja inkubeeriti

segu toatemperatuuril 10 – 20 minutit. Järgnevalt lisati 2 ml PBS-Tween lahust ning tsentrifuugiti 10 minuti jooksul 400 g juures. Selleks, et detekteerida CD45- ja CD53-positiivseid leukotsüüte, resuspendeeriti sperma rakud 80 µl blokeerimislahuses, kuhu lisati hiire valmistatud inimese CD45 ja CD53 vastaste monoklonaalsete antikehade anti-CD45 FITC konjugaati [lahjendus 1:10, (BD PharMingen, Ameerika Ühendriigid)] ja anti-CD53 RPE-konjugaati [lahjendus 1:10, (*R-phycoerythrin*), (BD PharMingen, Ameerika Ühendriigid)] ning Rnaas-i (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Segu inkubeeriti 37°C juures 30 minutit. Seejärel lisati 3 ml PBS-Tween lahust ning tsentrifuugiti 10 minuti jooksul 400 g juures. Rakud suspendeeriti 400 µl PBS-is.

Positiivse kontrollina lisati proovidele venossest verest eraldatud leukotsüüte. Leukotsütide eraldamiseks kasutati HISTOPAQUE-1119 ja HISTOPAQUE-1077 lahuseid (Sigma, Saksamaa). Selleks asetati 15 ml katseklaasi 3 ml HISTOPAQUE-1119 lahust ja lisati sellele ettevaatlikult 3 ml HISTOPAQUE-1077 lahust nii, et erinevate lahuste kihid omavahel ei seguneks. Seejärel lisati katseklaasi ettevaatlikult 6 ml verd ja tsentrifuugiti 30 minuti jooksul 700 g juures. Peale tsentrifuugimist on võimalik katseklaasis eristada erinevaid rakkude kihte - monotsüüte, granulotsüüte ning erütrotsüüte. Monotsüüdid ja granulotsüüdid pipeteeriti uude katseklaasi ja lisati 10 ml PBS-i. Seejärel tsentrifuugiti rakke 10 minuti jooksul 200 g juures. Tsentrifugimise etappi korrati kahel korral. Seejärel jagati saadud suspensioon võrdselt kontrollproovide vahel ja proove töödeldi järgides eelpoolkirjeldatud protokollid.

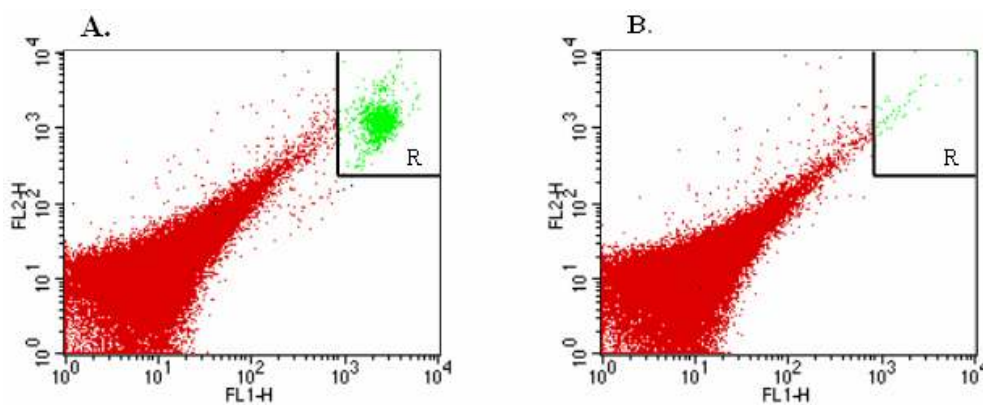
Haploidsete, diploidsete ja polüploidsete rakkude populatsioonide eristamiseks kasutati kontrollproovina hiire valmistatud inimese CD45 vastase anti-CD45 FITC konjugaadiga märgistamist, järgides eelpoolkirjeldatud protokollid. Antud kontrollproov suspendeeriti 400 µl 7AAD (lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml) PBS-is ning proovid analüüsiti kasutades läbivoolu tsütomeetrit.

Leukotsütide kontsentratsiooni arvutamisel võeti aluseks eeldus, et 7AAD-ga värvimisel eristunud haploidsete rakkude populatsioon võrdub valgusmikroskoobis loetud seemnerakkude kontsentratsiooniga. Sellest tulenevalt jäeldati, et ka läbivoolu tsütomeetrial saadud leukotsütide hulk omab võrdelist seost patsiendi seemnevedelikus esinevate leukotsütide kontsentratsiooniga.

### 2.1.5.2. Sperma leukotsüütide detekteerimine läbivoolu tsütomeetrial

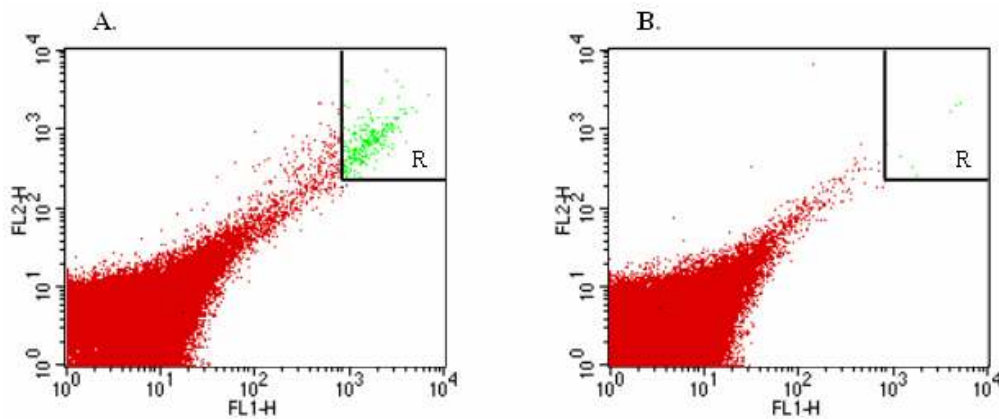
Leukotsüütide detekteerimiseks seemnevedelikus kasutati hiires valmistatud inimese CD45 ja CD53 vastaseid konjugeeritud antikehi anti-CD45 FITC (signaal rohelises kanalis – FL1-H) ning anti-CD53 RPE (signaal oranžis kanalis – FL2-H). Seemnerakkude hulga määramisel proovides kasutati 7AAD-ga värvimist.

Määratlemaks leukotsüütide positiivset signaali sisaldavat regiooni, kasutati positiivse kontrollina venoossest verest eraldatud leukotsüüte (Joonis 6.). Varasemad uuringud on näidanud, et nende rakkude tsütomeetrilised omadused on võrreldavad seemnevedelikus esinevate leukotsüütide vastavate näitajatega (Ricci et al. 2000).



**Joonis 6.** Sperma leukotsüütide määramisel kasutatud R - regiooni defineerimine. Graafikul 6. A. on patsiendi spermaproovile lisatud positiivne kontroll - verest eraldatud leukotsüüdid (signaal regioonis R on positiivne nii rohelises FL1-H kanalis kui ka oranžis FL2-H kanalis). Graafikul 6. B. on esitatud patsiendi spermaproov ilma positiivse kontrollita





**Joonis 7.** Leukotsüütide detekteerimine seemnevedelikust. Graafik 7. A. – leukotsüütide kontsentratsioon  $1 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas. Graafik 7. B. – leukotsüütide kontsentratsioon  $0.02 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas

Joonisel 7. on toodud illustreerivad graafikud sperma leukotsüütide detekteerimisest läbivoolu tsütomeetri abil. Joonisel 7. A. on sperma leukotsüütide kontsentratsioon  $1 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas ning Joonisel 7. B. on sperma leukotsüütide kontsentratsioon  $0.02 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas.

### 2.1.6. Tulemuste analüüs

Antud magistritöös analüüsiti seemnerakkude erinevate voolutsütomeetria parameetrite (DNA-katketate esinemissagedus, DNA metüleerituse ulatus, akrosoomi intaktsus ja leukotsüütide esinemine) seost IVF- ja ICSI-protseduuride erinevate kvaliteedinäitajatega (munarakkude viljastumise ulatus, hea kvaliteediga embrüote osatähtsus ja rasedumise tõenäosus). Munarakkude viljastumist väljendatakse IVF- ja ICSI-protseduuris sügootide ja munarakkude suhtega. Hea kvaliteediga embrüos esineb tsütoplasmaatilist fragmentatsiooni kuni 20 % ulatuses embrüo ruumalast. Naise rasedumist kontrolliti IVF- ja ICSI-protseduurides 2 nädalat pärast embrüote siirdamist. Vereseerumi kooriongonadotropiini e. hCG tase  $> 10$  IU/l kinnitas raseduse esinemist. Kliiniline rasedus (lootemuna esinemine) määrati kindlaks ultraheli kasutades raseduse 6-7 nädalal. Statistiline analüüs viidi läbi SPSS (SPSS, Ameerika Ühendriigid) programmi kasutades.

## TULEMUSED

Käesolevas töös analüüsiti 238 IVF (n = 107) ja ICSI (n = 131) patsiendi seemnerakkude voolutsütomeetria parameetrite seost kehavälise viljastamise tulemuslikkusega. IVF-/ICSI-protseduuri läbinud naiste keskmine vanus  $\pm$  standardhälve ( $\pm$  SD) oli  $33.5 \pm 4.9$  aastat. IVF-/ICSI-protseduuri kasutamise tulemusena rasedus (positiivne hCG test) 37.4 % (n = 89) ning ultraheli käigus tuvastati rasedus 25.6 % (n = 61) naistest.

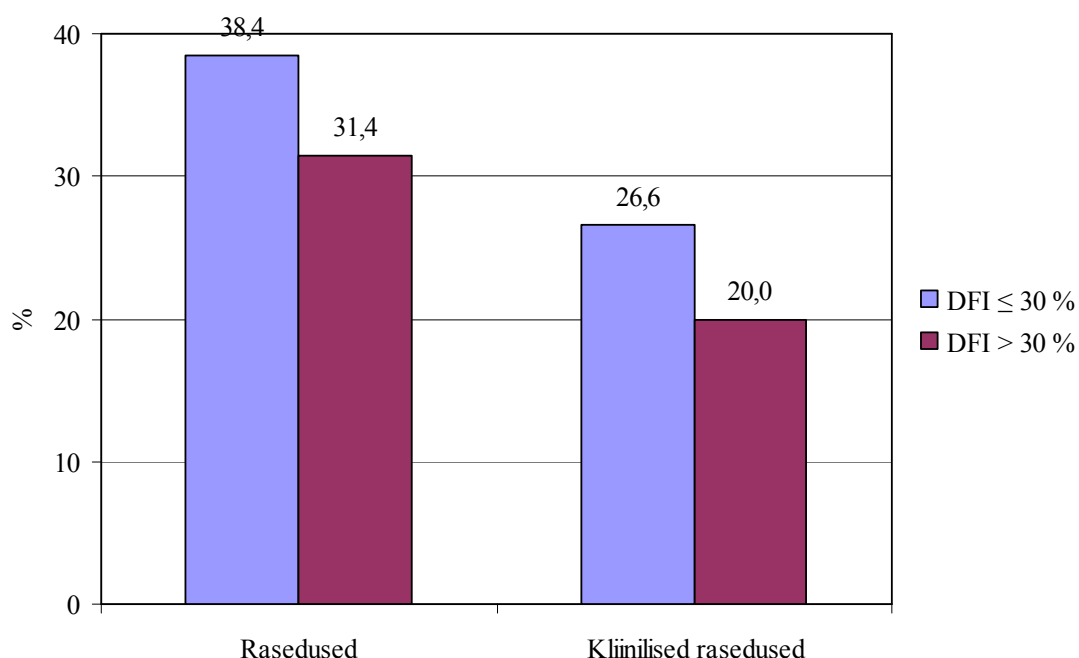
### 3.1. Seemnerakkude DNA analüüs SCSA meetodil

Käesolevas töös analüüsiti SCSA-meetodit kasutades 238 IVF- (n = 107) ja ICSI- (n = 131) protseduuridel osalenud patsiendi seemnerakkude kromatiini intaktsust. IVF-protseduuride korral oli keskmine ( $\pm$  SD) DFI väärtus  $12.7 \% \pm 9.4 \%$  (minimaalne DFI väärtus oli 0.9 % ning maksimaalne DFI väärtus oli 53.9 %). Keskmine ( $\pm$  SD) HDS väärtus IVF-protseduuride korral oli  $5.9 \% \pm 3.9 \%$  (minimaalne HDS väärtus oli 0.9 % ja maksimaalne HDS väärtus oli 23.1 %). ICSI-protseduuride korral oli keskmiseks ( $\pm$  SD) DFI väärtuseks  $21.5 \% \pm 14.0 \%$  (minimaalne DFI väärtus oli 1.2 % ning maksimaalne DFI väärtus oli 68.8 %). Keskmine ( $\pm$  SD) HDS väärtus ICSI-protseduuridel oli  $6.9 \% \pm 4.2 \%$  ning minimaalne ja maksimaalne väärtus olid vastavalt 0.3 % ja 26.5 %. ICSI-protseduuridel osalenud meestel oli DFI väärtus (21.5 %) oluliselt kõrgem kui IVF-protseduuri läbinud meeste DFI väärtus (12.7 %) (Mann-Whitney test;  $P < 0.001$ ). Samuti oli ICSI-protseduuri korral HDS väärtus kõrgem kui IVF-protseduuri kasutamise korral (6.9 % vs. 5.9 %; Mann-Whitney test;  $P = 0.018$ ).

IVF- või ICSI-raseduse esinemise (hCG test positiivne) korral olid DFI ja HDS väärtused ( $\pm$  SD) vastavalt  $17.0 \% \pm 13.3 \%$  ja  $6.7 \% \pm 4.5 \%$ . Kehavälise viljastamise ebaõnnestumise korral olid vastavad näitajad  $17.9 \% \pm 12.6 \%$  ja  $6.3 \% \pm 3.9 \%$ . DFI ja HDS väärtused ei erinenud rasedusega lõppenud (hCG positiivsed) ja ebaõnnestunud protseduuride korral (Mann-Whitney test). Kliiniliste raseduste korral olid DFI ja HDS väärtused vastavalt  $16.4 \% \pm 12.0$  ja  $6.5 \% \pm 4.4 \%$ .

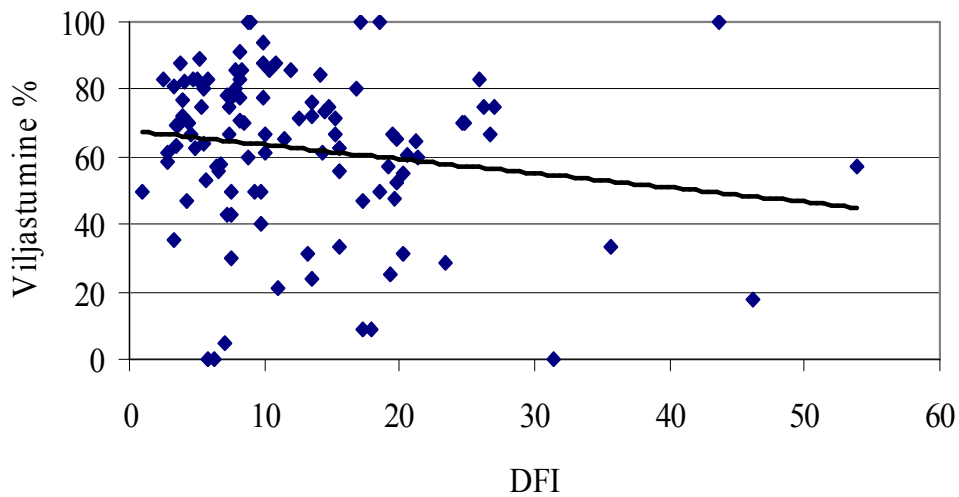
Ebaõnnestunud IVF- ja ICSI-protseduuride vastavad näitajad olid aga sarnased - 17.9 % ± 13.2 % ning 6.5 % ± 4.1 % (Mann-Whitney test; P = 0.518 ja P = 0.773).

Andmete edasisel analüüsil jaotasime patsiendid vastavalt DFI väärtusele kahte gruppi: DFI ≤ 30 % ja DFI > 30 %. IVF-protseduuride korral jaotusid patsiendid vastaval: DFI ≤ 30 % - 95.3 % (n = 102) ja DFI > 30 % - 4.7 % (n = 5). ICSI-protseduuride korral jaotusid patsiendid vastaval: DFI ≤ 30 % - 77.1 (n = 101) ja DFI > 30 % - 22.9 % (n = 30). Statistiline analüüs näitas, et ICSI-protseduuridel oli oluliselt rohkem patsiente, kelle seemnerakkude DFI oli > 30 % (22.9 % vs. 4.7 %; Fisher exact test; P < 0.001).

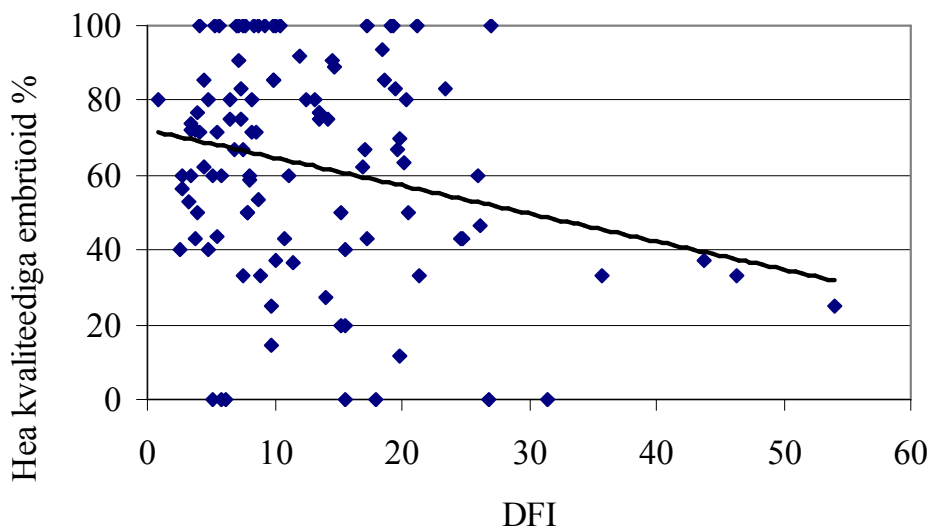


**Joonis 8.** Seemnerakkude DFI seos rasestumisega IVF-/ICSI-protseduuride korral (n = 238). DFI ≤ 30 % korral oli n = 203 ja DFI > 30 % korral oli n = 35. Antud erinevused ei olnud statistiliselt olulised ( $\chi^2$  test)

Seemnerakkude DFI ≤ 30 % korral oli IVF- ja ICSI-protseduuris raseduste (positiivne hCG test) ja kliiniliste raseduste tõenäosused 38.4 % (78/203) ning 26.6 % (54/203). DFI > 30 % korral olid vastavad näitajad madalamad – 31.4 % (11/35) ja 20 % (7/35). Siiski ei olnud antud erinevused statistiliselt olulised ( $\chi^2$  test) (Joonis 8.).



**Joonis 9.** Seemnerakkude DFI seos munarakkude viljastumisega IVF-protseduuride korral (n = 107). Pearsoni korrelatsioonikoefitsent  $r = -0.168$ ;  $P = 0.083$

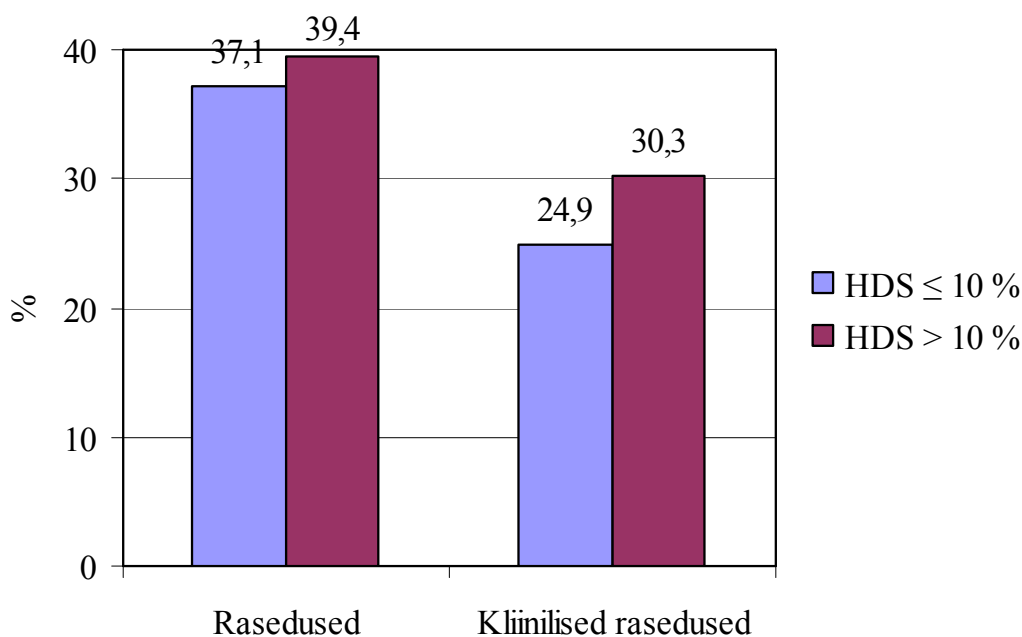


**Joonis 10.** Seemnerakkude DFI seos hea kvaliteediga embrüote hulgaga IVF-protseduuride korral (n = 107). Pearsoni korrelatsioonikoefitsent  $r = -0.243$ ;  $P = 0.012$

Seemnerakkude DFI ja munarakkude viljastumise korrelatsiooni analüüs IVF-protseduuride korral näitas seemnerakkude DFI ja munarakkude viljastumise tõenäosuse negatiivset, kuid statistiliselt piiripealset korrelatsiooni (Pearsoni korrelatsioonikoefitsent  $r = -0.168$ ;  $P = 0.083$ ) (Joonis 9.). Samuti esines negatiivne korrelatsioon DFI ja embrüote kvaliteedi vahel (Pearsoni korrelatsioonikoefitsent  $r = -$

0.243;  $P = 0.012$ ) (Joonis 10). ICSI-protseduuride korral seemnerakkude DFI viljastumise tõenäosusega ega embrüote kvaliteediga ei korreleerunud.

Hindamaks IVF- ja ICSI-protseduuridel osalenud patsientide HDS-värvunud seemnerakkude mõju viljatusravi tulemuslikkusele, kasutasime statistilises andmete analüüsis järgnevat HDS klassifikatsiooni:  $HDS \leq 10\%$  ja  $HDS > 10\%$  (Bungum et al. 2004). IVF-protseduuridel oli 91.6 % (98/107)  $HDS \leq 10\%$  ja 8.4 % (9/107)  $HDS > 10\%$  seemnerakkudega patsiente. ICSI-protseduuridel oli 81.7 % (107/131)  $HDS \leq 10\%$  ja 18.3 % (24/131)  $HDS > 10\%$  seemnerakkudega patsiente. Seega osales ICSI-protseduuridel oluliselt rohkem  $HDS > 10\%$  seemnerakkudega patsiente (18.3 %) kui IVF-protseduuridel (8.4 %;  $\chi^2$  test;  $P = 0.028$ ).



**Joonis 11.** Seemnerakkude HDS seos rasedumisega IVF-/ICSI-protseduuride korral ( $n = 238$ ).  $HDS \leq 10\%$  korral oli  $n = 205$  ja  $HDS > 10\%$  korral oli  $n = 33$ . Vastavad näitajad ei olnud statistiliselt olulised ( $\chi^2$  test)

$HDS \leq 10\%$  grupis olid raseduste (positiivne hCG) ja kliiniliste raseduste näitajad vastavalt: 37.1 % (76/205) ning 24.9 % (51/205).  $HDS > 10\%$  grupis olid aga raseduste (positiivne hCG) ja kliiniliste raseduste näitajad vastavalt: 39.4 % (20/33)

ning 30.3 % (10/33). Vastavad näitajad ei olnud statistiliselt olulised ( $\chi^2$  test) (Joonis 11.).

HDS-i ulatus seemnerakkudes ei mõjutanud munarakkude viljastumist ega ka embrüote kvaliteeti IVF- ning ICSI-protseduuride korral (Pearsoni korrelatsioonianalüüs).

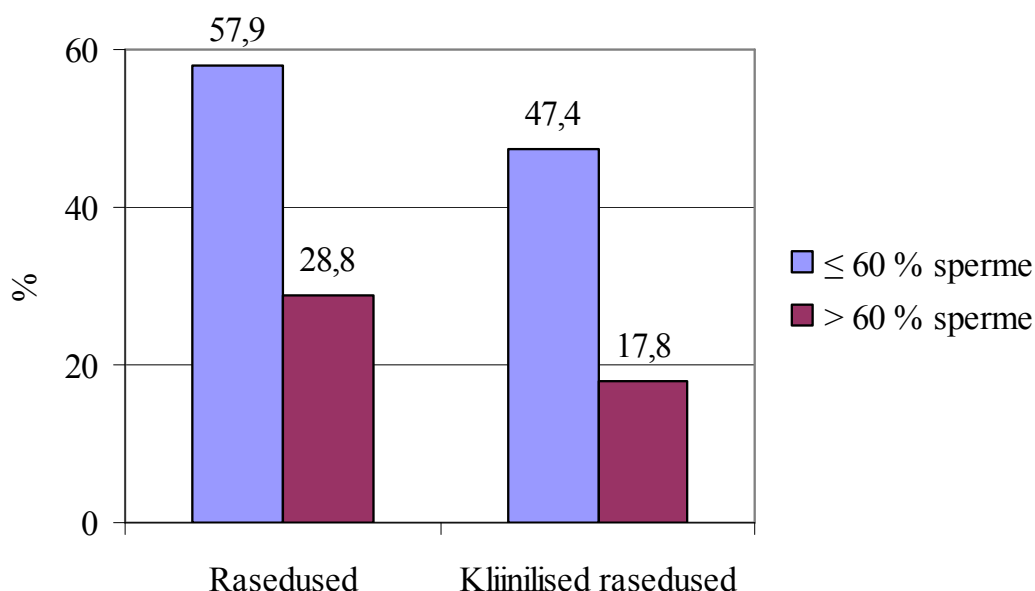
### **3.2. Seemnerakkude DNA metülatsiooni mõju kehavälise viljastamise tulemustele**

Käesolevas töös analüüsiti seemnerakkude metüleeritust 146 IVF- (n = 54) ja ICSI-protseduurides (n = 92) osalenud patsientidel. IVF-protseduuride korral oli keskmine ( $\pm$  SD) seemnerakkude metüleeritus 57.8 %  $\pm$  15.8 % (minimaalne ja maksimaalne väärtus vastavalt 26.4 % ja 80.4 %) (määratud M1 väravaga). ICSI-protseduuride korral oli keskmine ( $\pm$  SD) seemnerakkude metüleeritus 75.1 %  $\pm$  16.0 % (minimaalne ja maksimaalne väärtus vastavalt 37.1 % ja 93.5 %). ICSI-protseduuride korral oli seemnerakkude metülatsiooni homogeensus oluliselt suurem kui IVF-protseduuride korral (75.1 % vs. 57.8%; Mann-Whitney test;  $P < 0.001$ ).

Rasedusega (positiivne hCG test) ja kliinilise rasedusega lõppenud IVF-/ICSI-protseduuride korral olid keskmised ( $\pm$  SD) seemnerakkude metüleeritused 63.4 %  $\pm$  19.4 % ja 61.0 %  $\pm$  19.3 %. Ebaõnnestunud IVF-/ICSI-protseduuride korral olid aga vastavad näitajad 71.9 %  $\pm$  16.3 % ja 71.5 %  $\pm$  16.7 %. Rasedusega (positiivne hCG test) ja kliinilise rasedusega lõppenud IVF-/ICSI-protseduurides olid vastavad näitajad madalamad kui ebaõnnestunud kehavälise viljastamise protseduurides (63.4 % vs. 71.9 %; Mann-Whitney test;  $P = 0.01$  ning 61.0 % vs. 71.5 %; Mann-Whitney test;  $P = 0.003$ ).

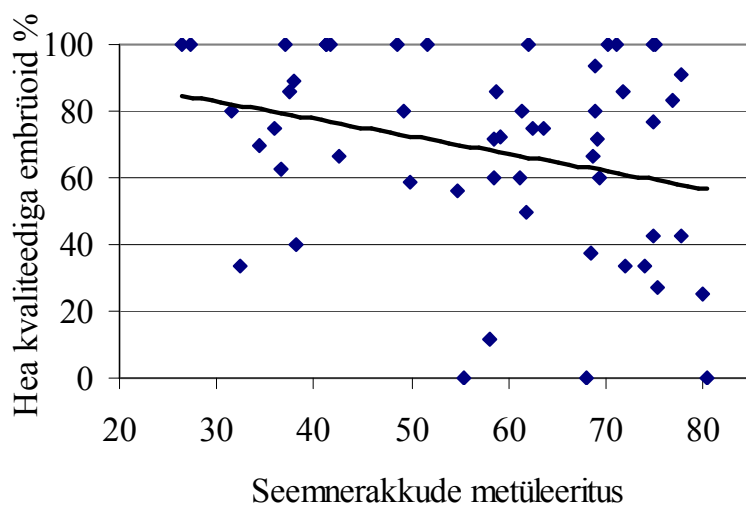
Seemnerakkude metüleerituse homogeensuse mõju statistilises analüüsis kasutasime järgnevat klassifikatsiooni: seemnerakkude metülatsioon  $\leq 60$  % (n = 45) ja  $> 60$  % (n = 101). IVF-protseduurides ei esinenud statistilisi erinevusi kahe metülatsiooni grupi ( $\leq 60$  % ja  $> 60$  %) vahel raseduste (positiivne hCG) ja kliiniliste raseduste esinemissagedustes. ICSI-protseduuride rasedustulemuste jaotus vastavalt seemnerakkude metüleeritusele on kujutatud Joonisel 12. ICSI-protseduurides, milles

seemnerakkude metüleeritus oli  $\leq 60\%$  esines oluliselt sagedamini rasedusi (positiivne hCG test) (57.9 %, 11/19) ja kliinilisi rasedusi (47.4 %, 9/19) kui ICSI-protseduurides, milles seemnerakkude metüleeritus oli  $> 60\%$  (28.8 %, 21/73,  $\chi^2$  test,  $P = 0.018$ ) ja (17.8 %, 13/73,  $\chi^2$  test,  $P = 0.007$ ).



**Joonis 12.** Seemnerakkude metüleerituse seos rasestumisega ICSI-protseduuride korral ( $n = 92$ ). Grupis  $\leq 60\%$  seemnerakkudest metüleeritud ( $n = 19$ ) esines oluliselt sagedamini rasedusi (positiivne hCG test) ( $\chi^2$  test,  $P = 0.018$ ) ja kliinilisi rasedusi ( $\chi^2$  test,  $P = 0.007$ ) võrreldes patsientidega, kelle seemnerakkude metüleerituse homogeensus oli  $> 60\%$  ( $n = 73$ )

Seemnerakkude metülatsiooni mõju uurimisel kehavälise viljastamise protseduuri ravitulemustele kasutasime samuti seemnerakkude metülatsiooni indeksit – V1/V, mis näitab keskmisest rohkem metüleeritud seemnerakkude osatähtsust spermas. Raseduste (positiivne hCG test) ning kliiniliste raseduste korral olid V1/V indeksi keskmised ( $\pm$  SD) väärtused vastavalt  $0.28 \pm 0.12$  ning  $0.28 \pm 0.13$ . Ebaõnnestunud IVF-/ICSI-protseduuride korral olid vastavad näitajad aga  $0.32 \pm 0.09$  ning  $0.32 \pm 0.09$ . Statistiline analüüs näitas, et rasedusega (positiivne hCG test) ning kliinilise rasedusega lõppenud IVF- ja ICSI-protseduuride korral olid seemnerakkude V1/V indeksid madalamad kui ebaõnnestunud protseduuride korral (vastavalt 0.28 vs. 0.32, t-test,  $P = 0.043$  ning 0.28 vs. 0.32, t-test,  $P = 0.045$ ).



**Joonis 13.** Seemnerakkude metüleerituse seos embrüote kvaliteediga IVF-protseduuride korral (n = 54). Pearsoni korrelatsioonikoeffitsent  $r = -0.283$ ;  $P = 0.038$

Seemnerakkude metülatsioon ei assotsieerunud munarakkude viljastumisega IVF- ega ka ICSI-protseduurides. IVF-protseduurides esines negatiivne korrelatsioon seemnerakkude metülatsiooni ja embrüote kvaliteedi vahel (Pearsoni korrelatsioonikoeffitsent  $r = -0.283$ ;  $P = 0.038$ ) (Joonis 13). ICSI-protseduuris seemnerakkude metülatsioon ja embrüote kvaliteet omavahel ei assotsieerunud.

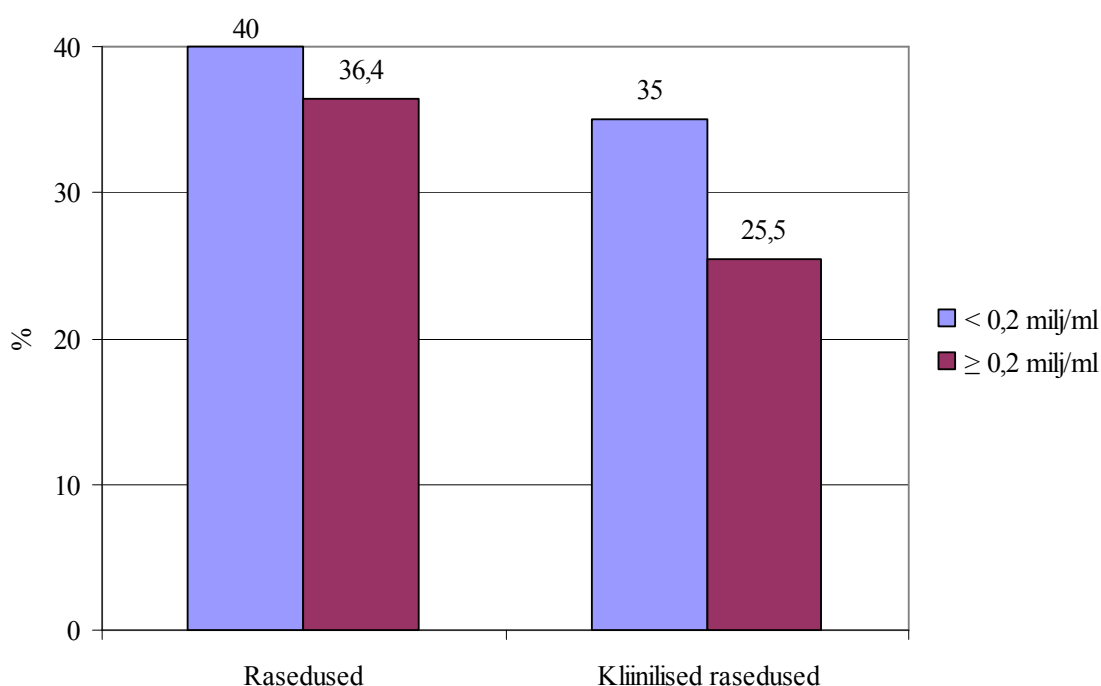
### 3.3. Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi hindamine

Käesolevas töös analüüsiti seemnerakkude akrosoomi staatust 54 IVF-protseduuridel osalenud mehel. Statistilises analüüsis kasutati seemnerakkude akrosoomi homogeensuse hindamisel järgnevat klassifikatsiooni:  $< 60\%$  (n = 26) ja  $\geq 60\%$  (n = 28). IVF-protseduurides, mille seemnerakkude akrosoomi homogeensuse indeks oli  $< 60\%$  viljastus oluliselt vähem munarakkusid (56.4 %, 199/353) kui IVF-protseduuride korral, mille seemnerakkude akrosoomi indeks oli  $\geq 60\%$  (63.9 %, 216/338,  $\chi^2$  test,  $P = 0.043$ ).



### 3.4. Sperma leukotsüütide detekteerimine

Käesolevas töös analüüsiti leukotsüütide esinemist seemnevedelikus 95 IVF- (n = 54) ja ICSI- (n = 41) protseduuridel osalenud patsiendil. Leukotsüütide keskmine ( $\pm$  SD) kontsentratsioon spermas oli  $0.4 \pm 0.5 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas (minimaalne ja maksimaalne väärtus vastavalt 0 ja  $4.6 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas). IVF- ja ICSI- protseduurides olid leukotsüütide kontsentratsioonid vastavalt  $0.4 \pm 0.7$  ja  $0.3 \pm 0.3 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas (Mann-Whitney test statistiliselt ebaoluline).



**Joonis 14.** Sperma leukotsüütide kontsentratsiooni mõju IVF-/ICSI-protseduuride (n = 95) rasedustulemustele. Patsiendid jaotati kahte gruppi:  $< 0.2 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas (n = 40) ja  $\geq 0.2 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas (n = 55). Statistiline analüüs ei tuvastatud erinevusi gruppide vahel ( $\chi^2$  test)

Tulemuste statistilisel analüüsil kasutasime järgnevat jaotust: leukotsüütide kontsentratsioon  $< 0.2 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas (n = 40) ja  $\geq 0.2 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas (n = 55) (Punab et al. 2003). IVF- ja ICSI-protseduuride rasedustulemused mõlemas rühmas on kujutatud Joonisel 14. Leukotsüütide kontsentratsiooni korral  $< 0.2 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas olid raseduste (positiivne hCG) ja kliiniliste raseduste esinemise tõenäosused vastavalt 40 % (16/40)

ja 35 % (14/40). Leukotsüütide kontsentratsiooni korral  $\geq 0.2 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml spermas olid raseduste (positiivne hCG) ja kliiniliste raseduste esinemise tõenäosused vastavalt 36.4 % (20/55) ja 25.5 % (14/55). Kuigi rasedusnäitajad olid esimeses IVF-/ICSI-protseduuride grupis kõrgemad, ei olnud need erinevused statistiliselt olulised ( $\chi^2$  test).

## ARUTELU

Lastetus on paljudes arenenud riikides kasvavaks probleemiks ning enam kui 50 % juhtudel on lastetuse põhjuseks mehepoolene viljatus (Punab et al. 2003). Kliinilises praktikas seemnerakkude kvaliteedi hindamisel kasutusel olevad mikroskoopiaal põhinevad meetodid ei anna meile piisavalt informatsiooni prognoosimaks lastetuse ravi tulemuslikkust. Seetõttu on viimasel aastakümnel läbi viidud palju erinevaid uuringuid leidmaks laboratoorseid meetodeid, mis võimaldaksid hinnata seemnerakkude lastetuse ravi tulemuslikkust mõjutavaid parameetreid.

Käesolevas töös uuriti voolutsütomeetria abil järgnevat seemnerakkude parameetreid: seemnerakkude DNA intaktsus ning metüleeritus; seemnerakkude akrosoomi piirkonna kvaliteet ja spermas esinevate leukotsüütide kontsentratsioon ning nimetatud parameetrite seoseid lastetuse ravi (IVF- ja ICSI-protseduurid) kvaliteedinäitajatega (munarakkude viljastumine, embrüote morfoloogiline kvaliteet ning raseduse tekkimise tõenäosus).

### 4.1. Seemnerakkude DNA analüüs SCSA meetodil

Käesolevas töös kasutasime seemnerakkude DNA intaktsuse määramisel vooltsütomeetriaal põhinevat SCSA testi. Saadud tulemuste põhjal tuvastati, et ICSI-protseduuridel osalenud meestel oli DFI väärtus (21.5 %) oluliselt kõrgem kui IVF-protseduuri läbinud meestel (12.7 %) (Mann-Whitney test;  $P < 0.001$ ). Samuti oli ICSI-protseduuride korral, võrreldes IVF-protseduuridega, rohkem patsiente, kelle seemnerakkude DFI oli  $> 30\%$  (22.9 % vs. 4.7 %; Fisher exact test;  $P < 0.001$ ). Lisaks oli ICSI-protseduuri korral seemnerakkude HDS-i väärtus kõrgem kui IVF-protseduuri patsientidel (6.9 % vs. 5.9 %; Mann-Whitney test;  $P = 0.018$ ). Kuigi DFI ja HDS keskmised väärtused ei erinenud rasedusega lõppenud ja ebaõnnestunud protseduuride vahel, esines IVF- ja ICSI-protseduuridel osalenud patsientide grupis, kelle seemnerakkude DFI oli  $\leq 30\%$  rohkem rasedusi (hCG test positiivne) ja kliinilisi rasedusi võrreldes patsientidega, kelle seemnerakkude DFI oli  $> 30\%$ . Siiski ei olnud antud erinevused statistiliselt olulised.

Käesolevas töös uurisime samuti seemnerakkude DFI väärtuse tähtsust munarakkude viljastumisele ning embrüote arengule. IVF protseduuride korral oli seemnerakkude DFI väärtus oluline nii munarakkude viljastumisele kui ka embrüote arengule. Seemnerakkude DFI väärtuste ja munarakkude viljastumise vahel esines negatiivse korrelatsioon (statistiliselt piiripealne; Pearsoni korrelatsioonikoefitsent  $r = -0.168$ ;  $P = 0.083$ ). Samuti esines negatiivne assotsiatsioon seemnerakkude DFI ning embrüote morfoloogilise kvaliteedi vahel (Pearsoni korrelatsioonikoefitsent  $r = -0.243$ ;  $P = 0.012$ ).

Meie uuringus näidatud negatiivne seos seemnerakkude DFI ning kehavälise viljastamise rasedustulemuste vahel on kooskõlas eelnevate tulemustega (Chohan et al. 2004; Virro et al. 2004). Evensoni ja Wixoni (2006) poolt läbi viidud metaanalüüs näitas, et IVF-protseduuris on DFI < 30% korral rasestumise tõenäosus ligikaudu 2 korda suurem kui DFI  $\geq 30$  % korral (Evenson and Wixon 2006). Samas ICSI-protseduuri kasutamise korral on vastav erinevus 1.6 korda (statistiliselt ebaoluline) (Evenson and Wixon 2006). Samuti näitas Bungum *et al.*, et SCSA meetodil saadud DFI väärtused võimaldavad prognoosida rasestumise tõenäosust IVF- ja ICSI-protseduurides (Bungum et al. 2004). Lisaks kehvematele rasedustulemustele, esineb seemnerakkude kõrgemate DFI väärtuste korral ka sagedamini raseduste katkemisi (Evenson et al. 1999). Kõikidest IVF- ja ICSI-protseduuri raseduste katkemistest on seemnerakkude DNA kahjustustest põhjustatud ligikaudu 40 % (Evenson et al. 1999).

Muutunud DNA-protamiinide vahelistest interaktsioonidest tulenev suurenenud DNA värvumus (kõrgem seemnerakkude HDS-i väärtus) viitab seemnerakkude ebaküpsusele, mis omakorda tuleneb ebapiisavast epididüümises veedetud ajast (Seligman et al. 1994). Antud uurimustöös ei mõjutanud seemnerakkude HDS-i väärtus IVF- ja ICSI-protseduurides munarakkude viljastumist, embrüote arengut ega ka rasestumise tõenäosust. Seemnerakkude HDS-i näitaja ning kehavälise viljastamise parameetrite omavaheliste seoste puudumine võib tuleneda asjaolust, et munaraku suudavad viljastada siiski vaid piisavalt epididüümises küpsenud seemnerakud.

## 4.2. Seemnerakkude DNA metülatsiooni mõju kehavälise viljastamise tulemustele

DNA metülatsioon on tähtis kromatiini epigeneetilise regulatsiooni vahend. DNA-metülatsioon omab suurt tähtsust nii transkriptsiooni regulatsioonis, geenide imprintingus kui ka X-kromosoomi inaktivatsioonis. Käesolevas töös uuriti seemnerakkude DNA metülatsiooni ulatuse mõju kehavälise viljastamise tulemustele. Mitmed uuringud on näidanud gameetide DNA metüleerituse tähtsust munarakkude viljastumisele kui ka embrüo arengule. Samuti on oluline munarakkude ja seemnerakkude DNA erinev metüleeritus. Munarakkude DNA on suhteliselt hüpometüleeritud ning seemnerakkude DNA hüpermetüleeritud (Monk et al. 1987). Inimese varajase embrüo arengu kestel toimub aga DNA demetüleerimine, mis toimub isapoolsetel kromosoomidel aktiivselt (ensümaatiliselt) ning emapoolsetel kromosoomidel passiivselt (rakujagunemiste käigus). Embrüo moorula ja blastotsüsti staadiumis leiab aga aset genoomi *de novo* metülatsioon, mis epigeneetiliselt modifitseerib embrüo genoomi vastavalt uutele vajadustele (Benchaib et al. 2005).

Käesolevas töös leiti, et seemnerakkude suhteline hüpometülatsioon (seemnerakkude madalam V1/V indeks) on seotud paremate kehavälise viljastamise rasedustulemustega. Rasedusega (positiivne hCG test) või kliinilise rasedusega lõppenud IVF- ja ICSI-protseduuride korral oli seemnerakkude metülatsiooni V1/V indeks madalam (vastavalt 0.28 ja 0.28) kui ebaõnnestunud kehavälise viljastamise protseduuride korral (vastavalt 0.32, t-test, P = 0.043 ning 0.32, t-test, P = 0.045). Eelnevalt on ainult ühel korral uuritud seemnerakkude DNA üldise metülatsiooni mõju IVF-protseduuride õnnestumisele (Benchaib et al. 2005). Nimetatud töös kasutati seemnerakkude DNA metülatsiooni hindamisel suhtelist ühikut (*AU e. arbitrary unit*), mille definitsiooni kahjuks autorid ei esita. Siiski demonstreerisid autorid, et IVF-protseduuri rasedustulemus oli 33.3% juhul kui seemnerakkude DNA metülatsioon oli > 555 suhtelist ühikut ning ainult 8.3 % kui seemnerakkude DNA metülatsioon oli < 555 suhtelist ühikut. Käesoleva ning Benchaib *et al.* (2005) tööde omavaheline võrdlus on raskendatud, kuna puudub informatsioon eelpool tsiteeritud töös kasutatud seemnerakkude DNA metülatsiooni mõõtühiku kohta. Käesolevas töös esines samuti negatiivne korrelatsioon embrüo morfoloogilise kvaliteedi ning

seemnerakkude DNA metülatsioonihet vahel, mis viitab seemneraku kvaliteedi olulisusele embrüo varajases arengus.

### 4.3. Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi hindamine

Kehavälise viljastamise protseduuris viljastatakse munarakud väljaspool naise organismi. Tavapärasel IVF-protseduuris segatakse munarakud ja seemnerakud katseklaasis ning viljastumine toimub 16-18 tunni jooksul. ICSI-protseduuris seevastu süstitakse seemnerakk otse munaraku tsütoplasmasse (Palermo et al. 1992). IVF-protseduur ebaõnnestub, kui munarakud *in vitro* tingimustes ei viljastu. ICSI-protseduuris on küll tagatud munarakkude viljastumine, kuid arvestades ICSI-protseduuri kallima maksumusega ning teatud meditsiiniliste komplikatsioonidega (ICSI-lastel võimalik sugukromosoomide aneuploidiate kõrgem esinemissagedus) (Bonduelle and Camus 1999) ei ole võimalik teostada ICSI-protseduuri kõikidele lastetutele paaridele. Seetõttu on äärmiselt vajalik enne kehavälise viljastamise protseduuri prognoosida munarakkude viljastumise tõenäosust.

Seemnerakkude morfoloogia on üks tähtsamaid munarakkude viljastumist mõjutavaid laboratoorseid parameetreid. Siiski ei viljastu munarakud kuni 5 % IVF-protseduuridel, vaatamata sellele et seemnerakud on morfoloogiliselt normaalsed. Seemnerakkude viljastamisvõime on suurel määral determineeritud seemneraku akrosoomi piirkonna kvaliteedi poolt. Käesolevas töös kasutasime voolutsütomeetriaal põhinevat meetodit seemnerakkude akrosoomi piirkonna kvaliteedi hindamisel. Konkreetset kasutati seemnerakkude akrosoomi piirkonna kvaliteedi hindamisel hiire valmistatud monoklonaalset antikeha 9H8, mille epitoobiks on inimese seemnerakkude akrosoomi piirkonnas esineva *zonadhesin*-i glükoproteiini mutsiinilaadsed domäänid (Sikut et al. 1992). Kasutades nimetatud monoklonaalset antikeha analüüsisime IVF-patsientide seemnerakkude akrosoomipiirkonna homogeensust. Analüüsist ilmnes, et seemnerakkude akrosoomipiirkonna homogeensus on tähtis laboratoorne parameeter, mis positiivselt determineerib munarakkude viljastumist IVF-protseduuris. Nimetatud korrelatsioon võimaldab tulevikus kindlaks määrata patsiente, kellel munarakud IVF-protseduuris ei viljastu ning seetõttu vajavad ICSI-protseduuri kasutamist.

#### 4.4. Sperma leukotsüütide detekteerimine

Sperma leukotsüüdid on üheks tähtsamaks reaktiivsete hapniku osakeste allikaks. Leukotsüütide poolt produtseeritud reaktiivsed hapniku ühendid kahjustavad nii seemnerakkude DNA-d kui ka plasmamembraani. IVF-protseduuris kasutatakse seemnerakkude protseduuriks ette valmistamisel tsentrifuugimist, mille abil ei ole võimalik vabaneda sperma leukotsüütidest. Seetõttu võivad IVF-protseduuri viljastamiskeskkonnas esinevad leukotsüüdid samuti kahjustada arenevate embrüote implantatsioonipotentsiaali. Sellest lähtuvalt on oluline uurida sperma leukotsüütide kontsentratsiooni mõju lastetuse raviprotseduuride rasedustulemustele.

Sperma leukotsüütide määramisel on võimalik kasutada traditsionaalseid mikroskoopiaal põhinevaid teste. Siiski on nimetatud testid ebatäpsed ning oluliselt täpsemaid ning reprodutseeritavaid tulemusi annab voolutsütomeetriaal põhinev diagnostika. Käesolevas uuringus tuginesime patsientide grupeerimisel Punab *et al.*, (2003) tööle, mille kohaselt tuleks põletikuravile pöörata suuremat tähelepanu juba leukotsüütide kontsentratsiooni  $\geq 0.2$  miljonit leukotsüüti 1 ml spermas korral (Punab *et al.* 2003). Lähtuvalt sellest jaotasime patsiendid kahte gruppi vastavalt sperma leukotsüütide kontsentratsioonile:  $< 0.2$  ja  $\geq 0.2$  miljonit leukotsüüti 1 ml spermas. Meie uuringus esines selgelt trend, mille korral leukotsüütide kontsentratsioon  $\geq 0,2 \times 10^6$  leukotsüüti 1 ml seemnevedelikus mõjub negatiivselt IVF- ja ICSI-protseduuride rasedustulemustele. Siiski olid erinevused statistiliselt ebaolulised. Tuvastatud trend, mille korral kehavälise viljastamise rasedustulemused halvenevad leukotsüütide kontsentratsiooni kasvamisega viitab meeste suguteede põletikuliste protsesside (ravi) olulisusele paari lastetuse ravi seisukohalt.

## KOKKUVÕTE

Lastetuse ravi kasutamise tulemusena rasestub ning sünnitab lapse ~1/3 protseduuri läbinud naistest. Viimastel aastatel on palju tegeldud küsimusega, kui palju sõltub munarakkude viljastumine, embrüote *in vitro* areng ning naise rasestumise tõenäosus IVF-protseduuris seemnerakkude kvaliteedist.

Traditsionaalselt kasutatakse seemnerakkude analüüsil mikroskoopial põhinevaid diagnostikameetodeid. Siiski on nimetatud meetodite kasutusvaldkond kitsendatud ning tulemuste interpreteerimine raskendatud. Viimase kümne aasta jooksul on kasutusele võetud läbivoolu tsütomeetrial põhinevaid seemnerakkude analüüsimeetodeid, mille eelisteks traditsionaalsete seemnerakkude analüüsimeetodite ees on suurem objektiivsus ning reprodutseeritavus.

Käesolevas töös võeti esmakordselt Eestis kasutusele ning juurutati täiesti uusi voolutsütomeetrial põhinevaid seemnerakkude analüüsimeetodeid. Konkreetselt uuriti: seemnerakkude DNA intaktsust ja metüleeritust, seemnerakkude akrosoomi piirkonna kvaliteeti ning sperma leukotsüütide kontsentratsiooni ning nende parameetrite seoseid kehavälise viljastamise erinevate kvaliteedinäitajatega. Seemnerakkude DNA kahjustuste ulatuse ning munarakkude viljastumise, embrüote kvaliteedi ja patsientide rasestumise tõenäosuse vahel esines negatiivne korrelatsioon. Samuti oli huvitav, et patsientide rasestumise tõenäosus oli kõrgem kehavälise viljastamise protseduurides, kus seemnerakud olid hüpometüleeritud. Seemnerakkude akrosoomi kvaliteedi ja munarakkude *in vitro* viljastumise vahel leitud seos võimaldab tulevikus paremini planeerida paari lastetuse ravi. Lisaks demonstreeriti pöördvõrdelise seose esinemist sperma leukotsüütide kontsentratsiooni ning kehavälise viljastamise rasedustulemuste vahel.

Kokkuvõtteks kinnitavad meie tulemused seemnerakkude kvaliteedi olulisust lastetuse ravis ning võimaldavad tulevikus kasutusele võtta uusi, voolutsütomeetrial baseeruvaid seemnerakkude analüüsimeetodeid.



## SUMMARY

Only about ~1/3 of women attending infertility treatment by IVF-procedure are able to conceive and to give birth. During the past years a lot has been dealt with the issue whether sperm quality has significant impact on the outcome of oocyte fertilization, *in vitro* embryo development and pregnancy outcome in IVF.

Traditionally, sperm quality evaluation has relied on methods based on light microscopy. However, these methods are not providing enough information and are hard to interpretate. During the past ten years new methods based on flow cytometry have been brought to the field of analysing sperm quality. These methods are more objective and highly reproducible compared to traditionally used methods.

In the current study, sperm analysis by flow cytometry has been used for the first time in Estonia. More specifically, the impacts of the sperm DNA quality and methylation, the sperm acrosome status and the concentration of seminal leucocytes on the outcome of assisted reproduction were evaluated. A negative correlation was found between the extent of sperm DNA damage and oocyte fertilization, embryo quality and pregnancy outcome of assisted reproduction. It was also intriguing that the conception rate was higher in couples whose spermatozoa were relatively more hypomethylated. An association between fertilization rates and sperm acrosome status shown in the present study, allows us to choose more efficient infertility treatment method for the infertile couples in the future. An inverse relationship was also demonstrated between the concentration of seminal leukocytes and the pregnancy rate of IVF/ICSI procedures.

For conclusion, our results confirm the great importance of sperm quality on the outcome of infertility treatment. The current results allow us to apply these new flow cytometry methods for analysing sperm quality in the future.

## TÄNUAVALDUSED

Olen väga tänulik oma juhendajatele Andres Salumetsale ja Professor Toivo Maimetsale igakülgse abi ja toetuse eest. Südamlikud tänusõnad Anu Sikutile, kes oli suureks abiks antud uurimustöö katsete planeerimisel ja läbiviimisel. Tänan Nova Vita Kliiniku kollektiivi meeldiva koostöö eest. Erilised tänusõnad Elle Talvingule, Peeter Karitsale, Kaie Rohtlale ja Karin Tammele. Samuti tänan TÜ MRI rakubioloogia õppetooli kollektiivi sooja vastuvõtu eest ning oma perekonda, kes on olnud suureks toeks.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Agarwal, A., R. A. Saleh, et al. (2003). "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction." *Fertil Steril* 79(4): 829-43.
- Ahmadi, A. and S. C. Ng (1999). "Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa." *J Exp Zool* 284(6): 696-704.
- Aitken, R. J., D. Buckingham, et al. (1992). "Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors." *J Reprod Fertil* 94(2): 451-62.
- Aitken, R. J., D. W. Buckingham, et al. (1996). "Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function." *Free Radic Biol Med* 21(4): 495-504.
- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2002). *Molecular biology of the cell*, 4th edition.
- Benchaib, M., V. Braun, et al. (2005). "Influence of global sperm DNA methylation on IVF results." *Hum Reprod* 20(3): 768-73.
- Bonduelle, M. and M. Camus (1999). "Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children." *Hum Reprod* 14 Suppl 1: 243-64.
- Bourne, H., D. Y. Liu, et al. (1995). "Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm." *Fertil Steril* 63(6): 1329-32.
- Braun, R. E., R. R. Behringer, et al. (1989). "Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid." *Nature* 337(6205): 373-6.
- Bungum, M., P. Humaidan, et al. (2004). "The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI." *Hum Reprod* 19(6): 1401-8.
- Carver-Ward, J. A., K. A. Jaroudi, et al. (1996). "High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa." *Hum Reprod* 11(9): 1923-8.
- Chan, P. J., B. C. Su, et al. (1994). "White blood cells in semen affect hyperactivation but not sperm membrane integrity in the head and tail regions." *Fertil Steril* 61(5): 986-9.
- Chohan, K. R., J. T. Griffin, et al. (2004). "Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation." *Andrologia* 36(5): 321-6.
- Coetzee, K., T. F. Kruger, et al. (1999). "Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer." *Fertil Steril* 71(1): 80-4.
- Cortes, D. (1998). "Cryptorchidism--aspects of pathogenesis, histology and treatment." *Scand J Urol Nephrol Suppl* 196: 1-54.
- Dailey, T., B. Dale, et al. (1996). "Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes." *Am J Hum Genet* 59(1): 176-84.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon (1993). "Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma." *Fertil Steril* 59(6): 1291-5.
- Endtz, A. W. (1974). "A rapid staining method for differentiating granulocytes from "germinal cells" in Papanicolaou-stained semen." *Acta Cytol* 18(1): 2-7.

- ESHRE (1998). "Male infertility update. The ESHRE Capri Workshop Group." *Hum Reprod* 13(7): 2025-32.
- ESHRE (2006). "Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE." *Hum Reprod*.
- Evenson, D. and R. Wixon (2006). "Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay." *Reproductive BioMedicine Online* 12(4): 466-472.
- Evenson, D. P., Z. Darzynkiewicz, et al. (1980). "Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility." *Science* 210(4474): 1131-3.
- Evenson, D. P., L. K. Jost, et al. (2000). "Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study." *J Androl* 21(5): 739-46.
- Evenson, D. P., L. K. Jost, et al. (1999). "Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic." *Hum Reprod* 14(4): 1039-49.
- Florman, H. M., C. Arnoult, et al. (1998). "A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels." *Biol Reprod* 59(1): 12-6.
- Garrett, C., D. Y. Liu, et al. (1997). "Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry." *Fertil Steril* 67(2): 362-71.
- Genesca, A., M. R. Caballin, et al. (1992). "Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg." *Hum Genet* 89(2): 181-6.
- Gilbert, S. F. (1994). *Developmental Biology*.
- Gundersen, G. G., Medill, L. and Shapiro, B. M (1986). "Sperm surface proteins are incorporated into the egg membrane and cytoplasm after fertilization." *Developmental Biology* 113: 207-217.
- Guzick, D. S., J. W. Overstreet, et al. (2001). "Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men." *N Engl J Med* 345(19): 1388-93.
- Hardy, D. M. and D. L. Garbers (1995). "A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor." *J Biol Chem* 270(44): 26025-8.
- Irvine, D. S., J. P. Twigg, et al. (2000). "DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality." *J Androl* 21(1): 33-44.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* 33 Suppl: 245-54.
- Jager, S. (1990). "Sperm nuclear stability and male infertility." *Arch Androl* 25(3): 253-9.
- Jeyendran, R. S. (2000). "Interpretation of semen analysis results. A practical guide."
- Johnson, M. H. a. E., Barry J (2000). *Essential Reproduction*.
- Jorgensen, N., A. G. Andersen, et al. (2001). "Regional differences in semen quality in Europe." *Hum Reprod* 16(5): 1012-9.
- Kao, S. H., H. T. Chao, et al. (1998). "Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa." *Mol Hum Reprod* 4(7): 657-66.
- Kasai, T., K. Ogawa, et al. (2002). "Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential." *Asian J Androl* 4(2): 97-103.
- Lambrea, E., R. Klaghofer, et al. (2006). "[Psychosocial aspects of patients with sexual dysfunction]." *Schweiz Rundsch Med Prax* 95(7): 226-31.

- Lee, J., J. H. Richburg, et al. (1997). "The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis." *Endocrinology* 138(5): 2081-8.
- Lenzi, A., L. Gandini, et al. (1997). "Antisperm antibody detection: 2. Clinical, biological, and statistical correlation between methods." *Am J Reprod Immunol* 38(3): 224-30.
- Lenzi, A., M. Picardo, et al. (1996). "Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy." *Hum Reprod Update* 2(3): 246-56.
- Leyton, L. and P. Saling (1989). "Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction." *J Cell Biol* 108(6): 2163-8.
- Li, E., C. Beard, et al. (1993). "Role for DNA methylation in genomic imprinting." *Nature* 366(6453): 362-5.
- Li, E., T. H. Bestor, et al. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." *Cell* 69(6): 915-26.
- Liu, D. Y. and H. W. Baker (1994). "Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro." *Hum Reprod* 9(9): 1694-700.
- Mak, V. and K. A. Jarvi (1996). "The genetics of male infertility." *J Urol* 156(4): 1245-56; discussion 1256-7.
- Marchetti, C., M. A. Gallego, et al. (2004). "Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters." *Hum Reprod* 19(5): 1127-34.
- Matsuda, Y., N. Seki, et al. (1989). "X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage." *Mutat Res* 211(1): 65-75.
- Mayer, W., A. Niveleau, et al. (2000). "Demethylation of the zygotic paternal genome." *Nature* 403(6769): 501-2.
- McPherson, S. M. and F. J. Longo (1993). "Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II." *Dev Biol* 158(1): 122-30.
- Menkveld, R., J. P. Rhemrev, et al. (1996). "Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro." *Fertil Steril* 65(3): 637-44.
- Moilanen, J. M., O. Carpen, et al. (1998). "Flow cytometric light scattering analysis, acrosome reaction, reactive oxygen species production and leukocyte contamination of semen preparation in prediction of fertilization rate in vitro." *Hum Reprod* 13(9): 2568-74.
- Monk, M., M. Boubelik, et al. (1987). "Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development." *Development* 99(3): 371-82.
- Mortimer, D. (1994). *Practical Laboratory Andrology*.
- Nikolettos, N., W. Kupker, et al. (1999). "Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology." *Hum Reprod* 14 Suppl 1: 47-70.
- Ochsendorf, F. R. (1999). "Infections in the male genital tract and reactive oxygen species." *Hum Reprod Update* 5(5): 399-420.
- Ozanon, C., J. Chouteau, et al. (2005). "Clinical adaptation of the sperm ubiquitin tag immunoassay (SUTI): relationship of sperm ubiquitylation with sperm quality

- in gradient-purified semen samples from 93 men from a general infertility clinic population." *Hum Reprod* 20(8): 2271-8.
- Palermo, G., H. Joris, et al. (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." *Lancet* 340(8810): 17-8.
- Pasqualotto, F. F., R. K. Sharma, et al. (2000). "Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation." *Fertil Steril* 73(3): 459-64.
- Pentikainen, V., K. Erkkila, et al. (2000). "Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* 85(5): 2057-67.
- Peschon, J. J., R. R. Behringer, et al. (1987). "Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15): 5316-9.
- Punab, M., K. Loivukene, et al. (2003). "The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint." *Andrologia* 35(5): 271-8.
- Razin, A. and H. Cedar (1994). "DNA methylation and genomic imprinting." *Cell* 77(4): 473-6.
- Reik, W., W. Dean, et al. (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." *Science* 293(5532): 1089-93.
- Ricci, G., G. Presani, et al. (2000). "Leukocyte detection in human semen using flow cytometry." *Hum Reprod* 15(6): 1329-37.
- Rufas, O., A. Gilman, et al. (1998). "Spontaneous and follicular fluid-induced acrosome reaction in sperm samples from in vitro fertilizing and nonfertilizing normozoospermic patients." *J Assist Reprod Genet* 15(2): 84-9.
- Sailer, B. L., L. K. Jost, et al. (1995). "Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay." *J Androl* 16(1): 80-7.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, et al. (1999). "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa." *Rev Reprod* 4(1): 31-7.
- Sakkas, D., O. Moffatt, et al. (2002). "Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis." *Biol Reprod* 66(4): 1061-7.
- Saulsbery, S. B. and M. F. Pohlhaus (1992). "Assessment and initial management of infertility." *J Am Acad Nurse Pract* 4(2): 53-7.
- Seligman, J., N. S. Kosower, et al. (1994). "Thiol-disulfide status of human sperm proteins." *J Reprod Fertil* 101(2): 435-43.
- Sharma, R. K., F. F. Pasqualotto, et al. (1999). "The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility." *Hum Reprod* 14(11): 2801-7.
- Sikut, R., S. Veromann, et al. (1992). "Ovarian carcinomas express a sperm acrosomal antigen, defined by monoclonal antibody 9H8." *Tumour Biol* 13(4): 217-25.
- Sutovsky, P., R. M. Turner, et al. (2003). "Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: possible implications for infertility and reproductive seasonality." *Biol Reprod* 68(2): 688-98.
- Trounson, A. a. G., David K (1993). *Handbook of In Vitro Fertilization*.
- Tulsiani, D. R. and A. Abou-Haila (2001). "Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments." *Zygote* 9(1): 51-69.
- Twigg, J., N. Fulton, et al. (1998). "Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human

- spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants." *Hum Reprod* 13(6): 1429-36.
- Van Assche, E., M. Bonduelle, et al. (1996). "Cytogenetics of infertile men." *Hum Reprod* 11 Suppl 4: 1-24; discussion 25-6.
- Ward, W. S. and D. S. Coffey (1991). "DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells." *Biol Reprod* 44(4): 569-74.
- Wassarman, P. M. (1999). "Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion." *Cell* 96(2): 175-83.
- WHO (1992). "WHO Sperm Antibody Workshop, Rome, Italy August 30, 1992."
- WHO (2000). Manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male.
- Virro, M. R., K. L. Larson-Cook, et al. (2004). "Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles." *Fertil Steril* 81(5): 1289-95.
- Visconti, P. E., G. D. Moore, et al. (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway." *Development* 121(4): 1139-50.