

Nova otkrića u humanoj reprodukciji i njihova primjena u metodama potpomognute oplodnje

Domjanović, Tina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:639231>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

NOVA OTKRIĆA U HUMANOJ REPRODUKCIJI I NJIHOVA PRIMJENA U
METODAMA POTPOMOŽNE OPLODNJE

RECENT DISCOVERIES IN HUMAN REPRODUCTION AND ITS USE IN ASSISTED
REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

SEMINARSKI RAD

Tina Domjanović

Preddiplomski studij Molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Romana Gračan

Zagreb, 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Građa i razvoj jajne stanice	1
1.2 Metode potpomognute oplodnje	3
2. KLJUČNI PROCESI U PREIMPLANTACIJSKOM RAZVOJU EMBRIJA	6
2.1 Razvoj i morfološke promjene embrija	6
2.2 Oslobođanje iz <i>zone pellucide</i>	7
3. FIZIOLOŠKE PROMJENE BLASTOCISTE	9
4. GENSKA EKSPRESIJA BLASTOCISTE	10
4.1 Mozaicizam	11
5. UTJECAJ ANTIOKSIDANSA NA KRIOPREZERVACIJU	14
6. METODE KORIŠTENE U PREIMPLANTACIJSKOM GENSKOM DIJAGNOSTICIRANJU	15
6.1 Komparativna genomska hibridizacija na čipu	15
6.2 SNP mikročipovi	16
6.3 qPCR.....	17
7. LITERATURA	19
8. SAŽETAK.....	23
9. SUMMARY	24

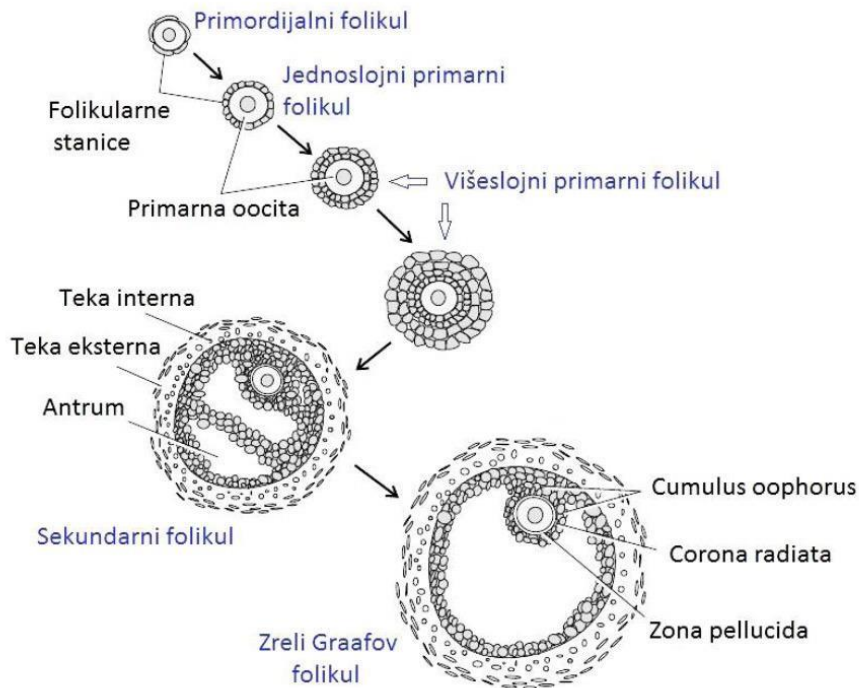
1. UVOD

S obzirom na neplodnost koja sve češće zahvaća kako žensku, tako i mušku populaciju, sve više parova odlučuje se za potpomognutu oplodnju. Metode potpomognute oplodnje (MPO) podrazumijevaju vantjelesnu oplodnju koja uključuje oplodnju *in vitro* (engl. *in vitro fertilisation*, IVF) i intracitoplazmatsku mikroinjekciju spermija (engl. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) te unutartjelesnu oplodnju koja uključuje inseminaciju. Postoje i modificirane metode IVF-a koje se rjeđe koriste; prijenos zigote u jajovod (engl. *zygote intrafallopian transfer*, ZIFT) i prijenos gameta u jajovod (engl. *gamete intrafallopian transfer*, GIFT). Prilikom oplodnje, bilo prirodne ili potpomognute, ključnu ulogu ima jajna stanica zbog čega je važno dobro poznavati procese vezane uz njen rast i razvoj.

1.1 Građa i razvoj jajne stanice

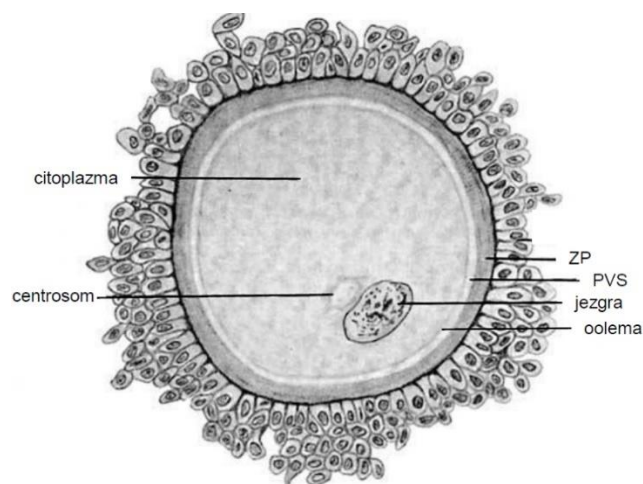
Folikulogeneza podrazumijeva rast i sazrijevanje folikula u kojem se nalazi nezrela oocita. Folikul se u početnom stadiju naziva primordijalni folikul koji razvojem prelazi u primarni, sekundarni i naposljetku u zreli Graafov folikul (slika 1). Primordijalni folikuli se sastoje od jajne stanice zaustavljene u profazi mejoze I okružene slojem granuloza stanica. Primarni folikuli nastaju rastom jajne stanice te umnožavanjem i diferencijacijom sloja granuloza stanica koje su usko povezane sa *zonom pellucidom* (ZP) i teka stanica između kojih prolaze krvne i limfne žile. Daljnjom proliferacijom granuloza i teka stanica oko oocite nastaju sekundarni folikuli. Teku stanice diferenciraju se u unutarnje (lat. *theca interna*) i vanjske (lat. *theca externa*). Između teka i granuloza stanica nalazi se bazalna membrana. Formira se šupljina (antrum) ispunjena folikularnom tekućinom koju luče granuloza stanice. Granuloza stanice diferenciraju se u muralne stanice povezane sa stjenkom folikula i stanice kumulusa povezane s jajnom stanicom. Daljnjim rastom, sekundarni folikuli razvijaju se u tercijarne Graafove folikule kod kojih se formira kumulus (lat. *cumulus oophorus*); nakupina usko povezanih granuloza stanica koje okružuju oocitu (Dević Pavlić, 2017). Imaju ulogu u održavanju razvoja folikula, sazrijevanju oocite i njenom navođenju prema jajovodu prilikom ovulacije. Kao odgovor na povećanu koncentraciju gonadotropina kumulus počinje lučiti hijaluronsku kiselinu u međustanične prostore pri čemu se potpuno razvija (Tanghe i sur., 2002). Ekspanzija kumulusa nužna je za proces ovulacije. Sloj kumulusa najbliži jajnoj stanici, usko povezan sa ZP, zove se *corona radiata* (Dević Pavlić, 2017). Nakon ovulacije, iz

rasprsnutog Graafova folikula pod utjecajem luteinizirajućeg hormona nastaje žuto tijelo (lat. *corpus luteum*) koje luči progesteron i estrogen. Ukoliko ne dođe do oplodnje propada i nastaje bijelo tijelo (lat. *corpus albicans*), a ako dođe do oplodnje žuto se tijelo održava djelovanjem ljudskog korionskog gonadotropina (hCG, glikoproteinski hormon koji izlučuju stanice trofoblasta, a kasnije i posteljica nekoliko dana nakon implantacije).



Slika 1. Razvojni stadiji folikula tijekom folikulogeneze (preuzeto i prilagođeno od Tyler, 2000).

Osnovni dijelovi jajne stanice su jezgra, citoplazma s organelima obavijena staničnom membranom (oolemom), perivitelini prostor i ZP (slika 2). U perivitelini prostor neposredno nakon oplodnje otpušta se sadržaj kortikalnih zrnaca koja okružuju membranu u koncentričnim slojevima. Uloga sadržaja kortikalnih zrnaca je sprječavanje polispermije (nakon ulaska jednog spermija u oocitu ZP postaje nepropusna) te zaštita i potpora u preimplantacijskom razvoju zametka. *Zona pellucida* je glikoproteinska opna građena od vlakana i granula uronjenih u matriks. Ima ulogu u zaštiti jajne stanice tijekom razvoja i transporta, u vezanju spermija za oocitu, induciranju akrosomske reakcije spermija vezanih za ZP (brza blokada polispermije depolarizacijom membrane) te u razvoju blastociste i sprječavanju preuranjene implantacije.



Slika 2. Građa jajne stanice (ZP – zona pellucida, PVS – perivitelini prostor) (preuzeto od Dević Pavlić, 2017).

1.2 Metode potpomognute oplodnje

Prilikom IVF postupka, najčešće je prvi korak kontrolirana hiperstimulacija jajnika (engl. *controlled ovarian hyperstimulation*, COH). Taj postupak nije obavezan, ali se preporuča kako bi se povećala vjerojatnost ovulacije pri čemu ovulirati može i više oocita, za razliku od ovulacije prirodnim putem kada normalno sudjeluje samo jedna oocita. Taj proces osim stimulacije jajnika egzogenom administracijom humanog menopauzalnog gonadotropina (hMG) i folikul stimulirajućeg hormona (FSH) (kako bi se stimulirao razvoj folikula i povećao broj oocita), može uključivati i supresiju hipofize pomoću agonista ili antagonista gonadotropin oslobađajućeg hormona (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) (Huang *i sur.*, 2014) kako bi se spriječio preuranjeni porast luteinizirajućeg hormona (LH) te zaustavljanje sazrijevanja folikula i asinkrono sazrijevanje oocite (Tarlatzis *i sur.*, 2006). Faza stimulacije obično traje 10-12 dana. Kada je veličina barem dva folikula preko 17 mm prestaje se s hormonskom stimulacijom. Kada je debljina endometrija zadovoljavajuća, a razina estradiola, koji regulira njegovu debljinu, odgovara veličini i broju folikula, administrira se humani korionski gonadotropin koji inducira ovulaciju koja će nastupiti nakon 34-36 h. Zatim slijedi aspiracija (punkcija) folikula; invazivni postupak kod kojeg se iglom iz abdomena usisa sadržaj folikula u kojem se nalazi i jajna stanica. Folikularni aspirat se inkubira u odgovarajućem mediju nakon čega se odabiru kvalitetne oocite koje se pripremaju za daljnji proces *in vitro* oplodnje ili se krioprezerviraju. Za postupak IVF, višak granulosa stanica se ukloni i jajne stanice se inkubiraju u kultivacijskom mediju skupa sa spermijima. Nakon oplodnje, bilo

procesom IVF ili ICSI, zigote se kultiviraju na posebnom mediju koji sadrži piruvat i neesencijalne aminokiseline koji su potrebni embriju u stadiju morule. Prelaskom u stadij blastociste, embriji se prebacuju na medij s glukozom i esencijalnim aminokiselinama. Osim nutrijenata, važni su optimalan pH, koncentracija plinova i temperatura. U stadiju blastociste (peti dan), kada je stopa implantacije i uspješne trudnoće najveća, embriji se prebacuju u maternicu. Prilikom procesa transfera embrija (ET) koji mora biti atraumatski, treba odabrati optimalnu lokaciju unutar maternice kako bi vjerojatnost implantacija bila maksimalna. Smatra se da je to područje 1-2 cm ispod dna maternice (lat. *fundus uteri*), izbočenog dijela iznad hvatišta jajovoda za maternicu. Na ishod transfera utječe i izbor katetera, popratno korištenje ultrazvuka za vizualizaciju i ET medij (Huang *i sur.*, 2014).

GIFT i ZIFT su modificirane metode IVF-a. GIFT je metoda koja se temelji na laparoskopskom transferu jajnih stanica i spermija u jajovod gdje se spontano događa oplodnja. Koristi se kod teške disfunkcije spermija, endometrioze i neplodnosti nepoznatog uzroka. Metoda ZIFT se temelji na prijenosu dvostaničnog embrija u jajovod (za razliku od klasičnog IVF gdje se embriji prenose direktno u maternicu, najčešće u stadiju blastociste). Razlika u odnosu na GIFT je što se nakon uzimanja jajnih stanica i spermija oplodnja odvija u *in vitro* uvjetima (Abyholm i Tanbo, 1993).

ICSI metoda koristi se u slučajevima teške muške neplodnosti. Kao i kod IVF, jajnici se mogu stimulirati nakon čega se punkcijom izolira jajna stanica u metafazi II. *Cumulus oophorus* se enzimatski ukloni pomoću hijaluronidaze, što također olakšava vizualizaciju jajne stanice tijekom procesa (Huang *i sur.*, 2014). Jajna stanica se pomoću aspiracijske mikropipete fiksira na stakalcu, a spermij normalne morfologije uzet iz ejakulata ili epididimisa se imobilizira tretiranjem polivinilpirolidonom (PVP) koji uzrokuje degradaciju repa spermija. Spermij se mikropipetom injicira u jajnu stanicu pod kutem od 90 stupnjeva od položaja polarnog tijela pri čemu probija ZP i ulazi u citoplazmu (Devroey i Van Steritghem, 2004). Postupci nakon oplodnje isti su kao i kod IVF.

Postoje tri tipa inseminacije, ovisno o mjestu unosa spermija; intrauterina (maternica), intracervikalna (vrat maternice) i intratubalna (jajovod). Prije unosa u maternicu, potrebno je ukloniti plazmu spermija kako bi se spriječila kontrakcija izazvana prostaglandinima (Aboulghar *i sur.*, 2009).

Jajne stanice i embriji začeti vantjelesnom oplodnjom mogu se pohraniti krioprezervacijom, u onim državama u kojima je to dopušteno zakonom. Krioprezervacija

obuhvaća metode smrzavanja embrija i jajnih stanica čime je omogućena njihova dugotrajna pohrana. Postoji kontrolirano, sporo smrzavanje i vitrifikacija koja je u posljednje vrijeme zamijenila metodu sporog smrzavanja. Kod metode kontroliranog, sporog smrzavanja embriji ili oocite postupno se tretiraju permeabilnim (glicerol, dimetilsulfoksid, etilen glikol, propilen glikol) i nepermeabilnim (sukroza, glukoza, fruktoza) krioprotektantima. Zatim se unutar tuba smrzavaju i zadržavaju nekoliko minuta na temperaturi od -5 °C do -7 °C nakon čega se spuštanjem temperature za 0,3 – 0,5 °C svake minute smrzavaju do temperature od -30 °C do -65 °C. Nakon toga tube se stavljaju u spremnike s tekućim dušikom za dugoročnu pohranu (Saragusty i Arav, 2011). Vitrifikacija podrazumijeva naglo smrzavanje pri čemu se potpuno izbjegne stvaranje kristala leda, ali se koriste veće koncentracije krioprotektanata. Nije potrebna skupa oprema niti metoda zahtijeva mnogo vremena. Nakon inkubacije u krioprotektantu (7,5%-tni etilen glikol i dimetilsulfoksid) te potom u vitrifikacijskoj otopini (sukroza te 15%-tni etilen glikol i dimetilsulfoksid) embriji se stavljaju direktno u tekući dušik (-196 °C) (Valojerdi *i sur.*, 2009).

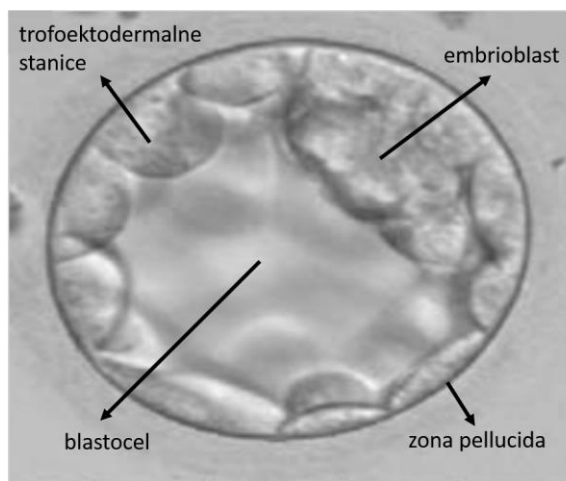
Upotreba *in vitro* oplodnje u porastu je i zbog preimplantacijskog genskog dijagnosticiranja koje se provodi u nekim državama u svrhu otkrivanja kromosomskih aberacija embrija. Iako je u zadnje vrijeme stopa uspješnosti metoda potpomognute oplodnje porasla, i dalje nije u potpunosti zadovoljavajuća, na što utječe mnogo faktora. Ovaj rad sagledava različite aspekte problematike na koju proces potpomognute oplodnje nailazi, moguća rješenja i novije metode koje su u sve većoj upotrebi.

2. KLJUČNI PROCESI U PREIMPLANTACIJSKOM RAZVOJU EMBRIJA

2.1 Razvoj i morfološke promjene embrija

Preimplantacijski razvoj embrija popraćen je nizom događaja nakon oplodnje, uključujući formiranje pronukleusa (3-10 sati nakon oplodnje) i stvaranja zigote koja se 20 sati nakon prirodne oplodnje ili MPO postupka počinje mitotički dijeliti svakih 12-18 sati. Serija brzih mitotičkih dioba sa svrhom generiranja većeg broja stanica za gastrulaciju i organogenezu naziva se brazdanje. Brazdanjem nastaju blastomere koje čine morulu kojoj nije potreban aktivni embrijski genom (Kakourou *i sur.*, 2013). Nakon trećeg brazdanja okrugle nepolarne blastomere prolaze proces kompakcije kada dolazi do iznenadne promjene u međusobnom prijanjanju stanica što omogućuje adhezijski protein E-kadherin. Stanice se povežu čvrstim spojevima te dolazi do njihove polarizacije. Diferenciraju se na unutarnje stanice iz kojih će se kasnije razviti embrioblast (eksprimiraju gene *Sox2*, *Nanog*, *Oct4*) i vanjske iz kojih će se razviti trofoblast (eksprimiraju gen *Cdx*). Između sukcesivnih dioba blastomere ne mijenjaju veličinu. Nakon četiri dana, na brazdanje se neposredno nadovezuje proces blastulacije kojim nastaje blastocista. Pojavljuje se radijalna polarnost koja omogućuje formiranje epitelnih stanica na površini embrija između kojih se formira *zonula adherens*. Površina blastociste prekrivena je mikrovilima, Golgijev aparat orijentiran je prema apikalnoj strani, a na bazalnoj se strani razvija bazalna lamina. Dolazi do akumulacije tekućine između stanica što rezultira postupnim nastankom centralne šupljine (blastocela) ispunjene tekućinom.. Broj stanica koje čine blastocistu može varirati od 24 do 322 (Hardarson *i sur.*, 2003). Blastocista sadrži dva tipa stanica: embrioblast, tj. unutarnja masa stanica (engl. *inner cell mass*, ICM) iz koje se razvija sami embrij i vanjska masa stanica, trofoektodermalne stanice koje sudjeluju u formiranju izvanembrionskih ovojnica (slika 3). Ta morfološka diferencijacija uvjetovana je potentnošću stanica te je ključna za daljnji razvoj embrija. Povećanjem volumena tekućine i broja stanica blastociste povećava se nastala šupljina, a ZP se stanjuje te se blastocista šesti dan nakon oplodnje oslobađa iz njega i implantira u endometriju.

U IVF postupcima analiziraju se morfološki stadiji razvoja blastociste i svrstavaju u četiri stupnja: prvi stupanj odnosi se na embrij čiji blastocel zauzima manje od 50% ukupnog volumena embrija, drugi stupanj na embrij čiji blastocel zauzima 50% volumena ili više, treći stupanj na embrij kod kojeg je blastocel u potpunosti razvijen, a ZP se stanjila, četvrti stupanj karakterizira embrij koji je uspješno izašao iz ZP (Magli *i sur.*, 2012).



Slika 3. Humana blastocista promatrana pod svjetlosnim mikroskopom, povećanje 400x (preuzeto i prilagođeno od Santos - Filho *i sur.*, 2012).

Kako bi postojao što univerzalniji način opisivanja blastociste, osmišljen je Gardnerov sustav ocjenjivanja koji uključuje evaluaciju stadija razvoja blastociste, kvalitete embrioblasta i trofoektoderma. Stadij razvoja blastociste ocjenjuje se brojevima od 1 do 6, gdje ocjena 1 opisuje blastocistu u kojoj je volumen blastocela manji od polovice volumena blastociste, ocjena 5 blastocistu koja je u procesu oslobađanja iz ZP, označavajući završni stadij razvitka blastociste, a ocjena 6 stadij u kojem se blastocista oslobodila iz ZP što znači da se takva blastocista ne može transferirati u maternicu. Embrioblast i trofoektoderm se ocjenjuju slovima A, B i C. Ocjena A opisuje čvrsto posložene, brojne stanice, dok ocjena C označava najgori stadij, odnosno vrlo malen broj stanica koje su neorganizirane. Najbolji ocjena blastociste za transfer je 5AA (Lubis i Halim, 2018).

2.2 Oslobađanje iz zone pellucide

Prvih 5-6 dana preimplantacijskog razvoja, embrij se nalazi unutar ZP. Oslobađanje embrija ovisi o embrijskim i endometrijskim enzimima te je popraćeno kontrakcijama i širenjem blastociste. Čak 75% morfološki normalnih blastocista ne mogu spontano napustiti ZP, što može biti jedan od glavnih uzroka neuspješne implantacije kod ljudi (Seshagiri *i sur.*, 2009). Syrkasheva *i sur.* (2017) istraživali su što utječe na uspješnost oslobađanja embrija iz ZP. Promatrali su blastociste šestog dana nakon oplodnje, prateći utjecaj dostignutog razvojnog stadija, kvalitetu oocita i embrija, debljinu ZP, dismorfizme oocite te ekspresiju mRNA za katepsin V (*CTSV*), GATA vezujući protein 3 (*GATA3*) i humani korionski gonadotropin

(hCG). Njihovi rezultati pokazuju da debljina ZP ne utječe na uspješnost izlijevanja, što nije očekivano budući da deblja ZP zahtijeva veću količinu litičkih enzima za njenu razgradnju. To upućuje da su takvi embriji najvjerojatnije razvili prilagodbe za pravodobnu razgradnju deblje ZP. Kvaliteta i prisutnost dismorfizama gameta nisu pokazali utjecaj na uspješnost oslobađanja. Blastociste visoke kvalitete, određene prema Gardnerovoj skali, imale su veću uspješnost od onih niže kvalitete. Blastociste koje se nisu dovoljno razvile do šestog dana nisu bile u mogućnosti osloboditi se ZP. S evolucijskog stajališta, to bi mogao biti mehanizam kojim se sprječava implantacija defektnih embrija. U blastocistama koje su uspješno izašle iz ZP uočena je visoka ekspresija *CTSV* mRNA, što upućuje na direktnu uključenost proteina katepsina V, čija točna uloga u embrionalnom razvoju nije još poznata. Također je uočena povezanost ekspresije gena *CTSV* s kvalitetom blastocista, što znači da je njegova ekspresija uvjetovana kvalitetom i stupnjem razvoja blastociste. Smatra se da gen *GATA3* ima ključnu ulogu u ranom embrionalnom razvoju. Ekspimiran je u trofoektodermu i regulira ekspresiju gena *Cdx2*. Delecija gena *GATA3* uzrokuje značajno smanjenje ekspresije *Cdx2*, što uzrokuje nepravilnosti u blastulaciji i nemogućnost formiranja blastociste. Razina ekspresije *GATA3* mRNA bila je značajno veća u blastocistama koje su mogle spontano izaći iz ZP i kod blastocista visoke kvalitete. Kod takvih blastocista bila je veća i ekspresija *CGB* mRNA, iako točna uloga proteina hCG na oslobađanje iz ZP nije poznata.

3. FIZIOLOŠKE PROMJENE BLASTOCISTE

Transformacija oplodene jajne stanice do stadija blastociste popraćena je ne samo morfološkim, već i fiziološkim promjenama. To posljedično utječe i na promjene u metaboličkim putovima. Metabolizam osim energije, pruža i biosintetske intermedijere koji su potrebni za proliferaciju. Poznavanje metabolita potrebnih za rane razvojne stadije embrija bitno je za određivanje sastava hranjivih podloga kako bi razvoj *in vitro* bio što uspješniji.

Do stadija morule mogućnost embrija da reagira na uvjete koji ga okružuju je ograničena jer još nema aktiviran genom te sustav koji regulira osmotski tlak nije u potpunosti funkcionalan. U stadiju pronukleusa energija se dobiva oksidativnom fosforilacijom, a za vrijeme brazdanja koriste se laktat, piruvat, neke aminokiseline i masne kiseline. Budući da mitohondriji nisu još u potpunosti razvijeni, prije kompakcije biosintetska aktivnost i potrošnja kisika je niska, glavni nutrijent je piruvat te dominira uloga majčinog genoma. U stadiju blastociste, s naglim rastom broja stanica, proizvodnja energije se u golemoj mjeri povećava te najviše ovisi o procesu glikolize, povećava se iskorištavanje glukoze, smanji iskorištavanje piruvata, a glavnu ulogu ima genom embrija. Potrošnja kisika se povećava što ukazuje na to da je za formiranje i održavanje blastocela potrebna energija koja se dobiva i aktivnošću natrij/kalij ATP-azne crpke. Energija je potrebna i za razgradnju ZP proteaznim enzimima. U metabolizmu blastociste za proizvodnju energije koristi se i aspartat koji preko malat-aspartatnog prijenosa ulazi u ciklus limunske kiseline te glutamin koji u ciklus limunske kiseline ulazi kao glutamat. Aminokiseline služe i kao pufer za održavanje unutarstanične vrijednosti pH, materijal za razvojne procese i izgradnju novih stanica te kao oksidansi. Uz aspartat, od aminokiselina najviše se koriste arginin, serin, metionin, valin i leucin. Metabolički procesi blastociste odvijaju se i u embrioblastu i trofoektodermu gdje pola glukoze bude pretvoreno u laktat (Lubis i Halim, 2018).

4. GENSKA EKSPRESIJA BLASTOCISTE

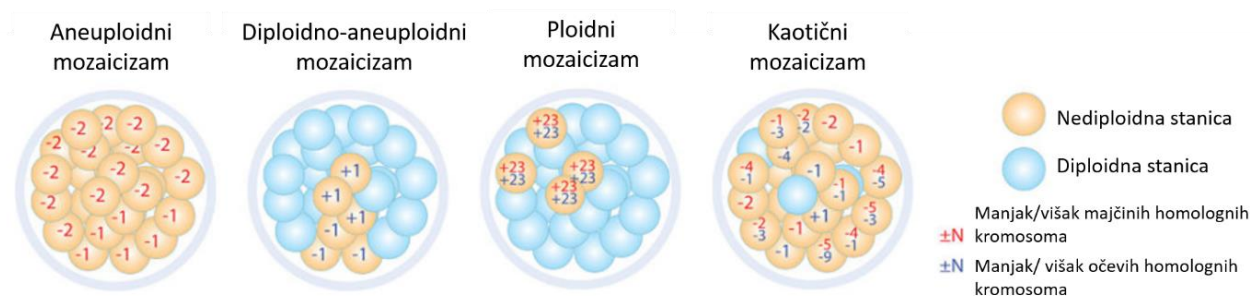
Poznato je 1909 gena eksprimiranih samo u oociti i 3122 eksprimiranih samo u blastocisti. Iako je oocita transkripcijski utišana tijekom profaze mejoze I, o njenim akumuliranim transkriptima i proteinima ovisi niz procesa kao što su remodeliranje kromatina tijekom oplodnje, preimplantacijski razvoj, mejoza (DNA i RNA metabolizam, aktivnost mikrotubula, ubikvitin ligazni kompleks), održavanje stanice, stanični ciklus, proliferacija i apoptoza. Nakon II mejotske diobe oocite, glavnu ulogu u genskoj ekspresiji ima Wnt signalni put koji je povezan s razvojem i funkcijom ovarija, preimplantacijskim razvojem embrija te razvojem endometrija i placente. Geni specifični za oocitu uključeni su u regulaciju metabolizma glikogena i lipida, održavanje ravnoteže kalcija, sintezu proteina koji služe za prijenos mitohondrija, ciklaza, citoskeletnih proteina. U oociti se ATP dobiva iskorištavanjem lipida i triglicerida. Već postojeći mitohondrijski proteini i transkripti potrebni su za proizvodnju ATP-a dok se ne aktivira genom embrija. Mitohondriji se pomiču pomoću mikrotubula, zbog čega je u oociti ekspresija citoskeletnih proteina visoka. Važnost mitohondrija i njihovog prijenosa očitava se u činjenici da su defekti u mitohondrijskoj DNA povezani s reduciranom sposobnošću dijeljenja i smanjenom plodnošću oocite, kao i s neuspješnim razvojem preimplantacijskog embrija. Oocita ima potpunu mašineriju potrebnu za sintezu cAMP-a koji kontrolira sazrijevanje jezgre. To uključuje receptore, gvanozin 5'-trifosfat-vezujuće (G) proteine, ciklaze (za sintezu cikličkih nukleotida) te fosfodiesteraze (za razgradnju cikličkih nukleotida). Identifikacija ovih gena specifičnih za oocitu ima značajnu važnost jer daljnjim istraživanjima mogu poslužiti kao parametri za procjenu kvalitete oocite. Geni embrija aktiviraju se u četverostaničnom i osmostaničnom stadiju, a između ostalih uključuju gene za aneksine A2 i A3 (ANXA2, ANXA3), adhezivni protein alfa 1 (GJPA1), gvanozin trifosfat-vezujući protein 4 (GTPBP4), S1 podjedinicu protonske V-ATP-aze (ATP6AP1). Geni blastociste povezani su uz oksidativnu fosforilaciju i glikolizu, odnosno procese koji služe za stvaranje ATP-a tijekom prekompakcije i stvaranja blastocela. Za razliku od oocite, blastocista pokazuje visoku ekspresiju gena uključenih u konverziju acetata u kolesterol. Put sinteze sterola nije aktivan prije stadija blastociste. Budući da oocita potrebne nutrijente može dobiti iz okolnih folikularnih stanica (*cumulus oophorus*) u njoj nisu detektirani u značajnoj mjeri procesi koji su aktivni u blastocisti. Geni specifični za blastocistu kodiraju veliki broj RNA-vezujućih proteina, metiltransferaza, adhezivnih proteina i intermedijarnih filamenata. Njihovom ekspresijom aktivira se Rho GTP-azni kontrolni put koji regulira citoskeletne promjene koje se događaju tijekom staničnog rasta i razvoja, PDGF put (engl.

platelet-derived growth factor network) koji je bitan za staničnu proliferaciju, metabolizam i reorganizaciju aktina te signalni put ovisan o integrinu koji također sudjeluje u reorganizaciji aktina (Kakourou *i sur.*, 2013).

4.1 Mozaicizam

Mozaicizam podrazumijeva postojanje dviju ili više linija stanica različitog genotipa, porijeklom iz jedne zigote. Najčešće nastaje kao posljedica mitotskih grešaka tijekom postzigotne stanične diobe, uključujući nefunkcioniranje staničnih kontrolnih točaka, aberacije centrosoma i nepravilne kohezije kromatida.

Mozaicizam se može podijeliti u dva tipa: aneuploidni i diploidno-aneuploidni, unutar kojih se mogu razlikovati ploidni i kaotični mozaicizam (slika 4). Aneuploidni mozaicizam podrazumijeva odsutnost diploidnih stanica i pojavljuje se u 15% embrija u stadiju morule. Može biti posljedica grešaka u mitozu kod embrija koji je već pogođen mejotskom aneuploidijom ili kada dođe do greške u prvoj mitozu prilikom čega nastanu dvije aneuploidne stanice kćeri. Diploidno-aneuploidni mozaicizam je najčešći tip, pogađa oko 50% embrija (McCoy *i sur.*, 2015). Podrazumijeva embrij koji uz aneuploidne, ima i normalne stanice. Uglavnom nastaje zbog grešaka u mitozu diploidne zigote, ali može i prilikom popravka mitotskih grešaka stanica nastalih iz diploidne zigote (Barbash-Hazan *i sur.*, 2009). Ploidni mozaicizam predstavljaju stanice koje sadrže broj kromosoma koji odgovara različitim višekratnicima haploidnog broja kromosoma ($n = 23$, kod ljudi). To može uključivati bilo koju kombinaciju haploidije (n), diploidije ($2n$) i poliploidije ($> 2n$) unutar jednog embrija. Najčešće se pojavljuje diploidno-triploidni mozaicizam (15%). Četvrti tip mozaicizma zapravo uključuje prethodno opisane tipove i sadrži obrazac velike nepravilnosti koja zahvaća više kromosoma, a svaka zahvaćena stanica posjeduje naizgled nasumičan kromosomski set. Najčešće se pojavljuje u prvoj mitotskoj diobi. Ovaj tip mozaicizma, usprkos velikoj učestalosti (25%) najmanje je proučen (Munne *i sur.*, 2002).



Slika 4. Mogući tipovi mozaicizma u preimplantacijskim embrijima (preuzeto i prilagođeno od McCoy, 2017).

U svome radu Bolton *i sur.* (2016) na modelu miša istraživali su kako napreduje razvoj aneuploidnih stanica za vrijeme preimplantacijskog razdoblja i posljedice mozaične aneuploidije na uspješnost razvitka embrija. Embriji u stadiju rane blastociste tretirani reversinom koji potiče aneuploidiju nisu pokazali značajne razlike u broju stanica u odnosu na netretirane embrije. Međutim, tretirani embriji u stadiju kasne blastociste imali su značajno smanjen broj stanica unutar trofoektoderma, primarnog endoderma i epiblasta u odnosu na kontrolne, ali uz normalnu segregaciju unutar sve tri stanične linije i normalnu morfologiju. Udio implantacije tretiranih, aneuploidnih embrija bio je značajno niži u odnosu na kontrolne te niti jedan embrij nije preživio. Takvi rezultati indiciraju na to da usprkos morfološki normalnom preimplantacijskom razvoju do stadija blastociste, aneuploidni embriji rezultiraju ranom postimplantacijskoj letalnosti. Također, učestalost apoptoze kod abnormalnih embrija, posebno kod embrioblasta značajno je veća, ukazujući da je poželjno da se aneuploidne stanice eliminiraju iz embrija. Nije dokazano da je u jednoj od staničnih linija veća vjerojatnost pojave aneuploidnih stanica nego u drugih, no pokazano je da postoje različiti mehanizmi uklanjanja abnormalnih stanica (Bolton *i sur.*, 2016). Stanice trofoektoderma imaju produžen stanični ciklus i senescenciju, dok stanice embrioblasta imaju veću učestalost apoptoze. Shodno tome, za razliku od stanica embrioblasta koje umiru, trofoektodermalne stanice su reducirane, ali vijabilne. Ukoliko takve stanice proliferiraju, formirajući stanice buduće placente, dolazi do pojave placentalnog mozaicizma. Istraživanje je pokazalo i da kod embrija koji sadrže 50% netretiranih, normalnih stanica uopće ne dolazi do rane postimplantacijske letalnosti te da je udio implantacije značajno povećan, kao i vijabilnost jer se abnormalne stanice razvijaju sporije i normalne stanice prevladaju reproducirajući normalno potomstvo. Ukoliko mozaični embrij preživi ranu postimplantacijsku fazu razvoja najvjerojatnije je da će se uspješno razvijati sve do rođenja. Kada je udio netretiranih blastomera smanjen na jednu trećinu, došlo je do postimplantacijske letalnosti. To dovodi do zaključka da će euploidno-diploidno mozaični

embriji biti vijabilni ukoliko postoji dovoljan udio normalnih stanica te da to nije posljedica samopopravka nego činjenice da se abnormalne stanice dijele sporije od normalnih. Ta saznanja mogu imati veliki klinički značaj u kontekstu biopsije embrija i preimplantacijskog genskog testiranja, kao i potencijalno objašnjenje zašto je kod biopsije embrija u stadiju morule, tijekom trećeg dana nakon oplodnje, smanjena uspješnost izvantjelesne oplodnje kod parova s lošom prognozom za ishod potpomognute oplodnje. Budući da je uzimanje stanica za testiranje embrija u kasnijoj fazi (peti dan razvoja) sigurnije, i omogućava uzimanje većeg broja stanica trofoektoderma, preporučuje se prelazak s biopsije stadija morule (treći dan razvoja) na biopsiju u stadiju blastociste (peti dan razvoja).

Ne postoji korelacija između tipa i veličine kromosoma pogođenog mozaicizmom i uspješnosti implantacije (Munne *i sur.*, 2017). Međutim, veći kromosomi imaju više segmentnih mozaičnih abnormalnosti (delecije, duplikacije) nego manji, što je očekivano jer su lomovi češći kod većih kromosoma (Gajecka, 2016). Još jedno važno otkriće (Munne *i sur.*, 2017) je da mozaični embriji s monosomijama imaju slični udio uspješne implantacije kao i oni s trisomijama. Iako anafazno zaostajanje može biti uzrok mitotskog mozaicizma, istraživanja su pokazala da ono uzrokuje samo 5% aneuploidnih mozaicizama, dok je većina uzrokovana nerazdvajanjem sestrinskih kromatida (Munne *i sur.*, 2002).

5. UTJECAJ ANTIOKSIDANSA NA KRIOPREZERVACIJU

Krioprezervacija humanih gameta i embrija rutinska je procedura korištena u metodama potpomognute oplodnje. Krioprezervacija brzim hlađenjem embrija procesom vitrifikacije zamijenila je proces sporog zamrzavanja koje se koristilo prvih 20 godina oplodnje in vitro. Postala je neizostavan proces prilikom preimplantacijskog genskog testiranja embrija, doniranja i čuvanja oocita. Međutim, takav proces embriju i oocitama predstavlja stres. Krioprezervacija podrazumijeva izlaganje embrija visokim koncentracijama krioprotektanata, visokoj osmolarnosti i ekstremnim promjenama temperature što može veliki utjecaj na fiziologiju i gensku ekspresiju gameta i embrija. Osmotski stres značajno povećava koncentraciju superoksidnih aniona preko procesa aktivacije NADPH oksidaze. Dolazi i do značajnog povećanja koncentracije hidrogen peroksida. Vitrifikacija uzrokuje i epigenetske promjene, djelujući na promjene u stupnju metilacije i acetilacije histona u oocitama i embrijima. Popravak štete nastale zbog krioprezervacije zahtjeva proizvodnju velike količine energije što također inducira porast kisikovih slobodnih radikala. Istraživano je zajedničko antioksidativno djelovanje acetyl-L-karnitina, N-acetyl-L-cisteina i α -lipoične kiseline na razvoj mišjeg embrija, acetilaciju histona i vijabilnost embrija nakon izlaganja vitrifikaciji i zagrijavanja. Pozitivno djelovanje uočeno je kada su antioksidansi dodani u krioprezervativne otopine, bez obzira na prisutnost antioksidansa u mediju u kojima su embriji kultivirani. Ukoliko su antioksidansi dodani samo tijekom zagrijavanja, njihovo pozitivno djelovanje izostaje, za razliku od dodavanja i za vrijeme vitrifikacije i zagrijavanja (ili samo vitrifikacije) kada su oksidativna oštećenja značajno smanjena, a broj stanica blastocista povećan. To upućuje na zaključak da oksidativna oštećenja najvećim dijelom nastaju tijekom procesa vitrifikacije. Analizom stupnja acetilacije histona prilikom krioprezervacije embrija uočeno je smanjenje stupnja acetilacije histona H3K9ac i H3K27ac za razliku od histona embrija koji nisu podvrgnuti krioprezervaciji. Aberantne promjene stupnja acetilacije histona mogu uzrokovati promjene u genskoj ekspresiji i stabilnosti. Dodatak antioksidansa djelovao je pozitivno sprječavajući smanjenje acetilacije, no ne u potpunosti. Iako su ovi antioksidansi bili poprilično efektivni, vrlo je vjerojatno da bi i drugi antioksidansi mogli imati dodatne zaštitne benefite. Njihovi rezultati pokazali su da ti antioksidansi osiguravaju značajnu zaštitu i od štetnih utjecaja kisikovih slobodnih radikala djelujući pozitivno na razvoj i vijabilnost embrija, rezultirajući povećanjem broja stanica i smanjenjem apoptotičnih stanica. Ovi rezultati upućuju na važnost antioksidansa kao moguće vrijedne strategije u postupcima medicinski potpomognute oplodnje kako bi razvoj bio uspješniji i vijabilnost embrija veća (Truong *i sur.*, 2020).

6. METODE KORIŠTENE U PREIMPLANTACIJSKOM GENSKOM DIJAGNOSTICIRANJU

Ranije često korištena metoda u preimplantacijskom genetičkom dijagnosticiranju, fluorescentna *In situ* hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) zbog niske specifičnosti i nemogućnosti skeniranja više kromosoma istodobno danas se sve više zamjenjuje novim metodama kao što su komparativna genomska hibridizacija na čipu (engl. *array-based comparative genomic hybridization*, aCGH), SNP mikročipovi (engl. *single nucleotide polymorphism microarrays*, SNP *microarrays*), kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) i sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) (McCoy, 2017).

6.1 Komparativna genomska hibridizacija na čipu

Metoda komparativne genomske hibridizacije (engl. *comparative genomic hybridization*, CGH) temelji se na hibridizaciji testne DNA (uzorak biopsije pacijenta) i referentne DNA na kromosomima u stadiju metafaze. Testna i referentna DNA obilježavaju se različitim fluorescentirajućima bojama te se nakon kohibridizacije mjeri odnos fluorescencije dviju boja kako bi se zaključilo je li neka od regija u kromosomima previše ili premalo eksprimirana. Najveća mana ove metode je što je analiza rezultata preduga u odnosu na vremenski okvir u kojem preimplantacijski embrij mora biti transferiran tj. vraćen u maternicu. Kao poboljšanje i zamjena ove metode razvijena je komparativna genomska hibridizacija na čipu.

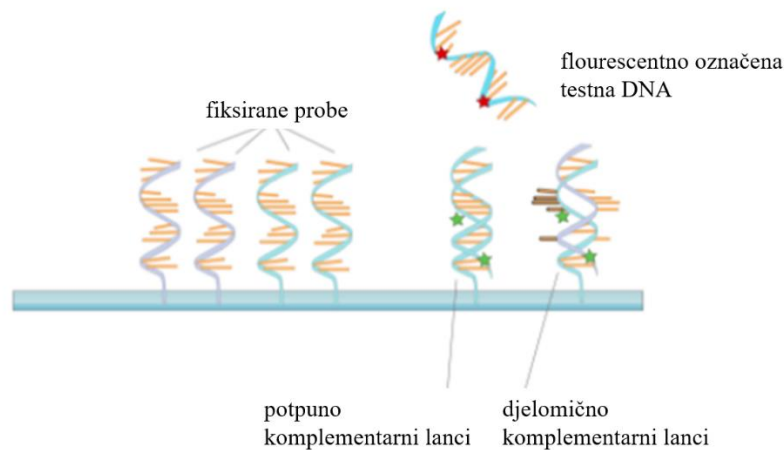
Metoda komparativne genomske hibridizacije na čipu (engl. *assay-based comparative genomic hybridization*, aCGH) preciznija je i ima višu rezoluciju od CGH jer probe koje se koriste mogu biti i do nekoliko redova veličine manje od metafaznih kromosoma. Ona se uglavnom zasniva na istim principima kao metoda CGH, ali se hibridizacija ne događa na kromosomima u metafazi, već na biočipovima, koji mogu biti oligonukleotidne probe koje predstavljaju područje genoma od interesa (25-85 parova baza) ili bakterijski kromosomi (80 000 – 200 000 parova baza). Iz uzorka se izolira DNA, amplificira, označi fluorescentnom bojom različitom od one kojom se označi normalna, referentna DNA te se ta dva uzorka DNA pomiješaju i postavljaju na čip prilikom čega dolazi do hibridizacije s probama. Zatim se na računalu dobije omjer signala fluorescencije testne i referentne DNA na različitim pozicijama u genomu (ovisno o probi), odnosno relativna vrijednost broja kopija sekvenci u testnoj DNA

u odnosu na referentnu. Prednosti ove metode su mogućnost istodobne detekcije aneuploidija, delecija i duplikacija, nije potrebno imati stanice u diobi te je potrebno neusporedivo manje vremena u usporedbi s FISH metodom; jedan čip ekvivalentan je tisućama FISH eksperimenata (Theisen, 2008). Ova metoda koristi se i kod otkrivanja Robertsonijevih i recipročnih translokacija, dok se ne može koristiti za otkrivanje poliploidija. Biopsija za ovu metodu može se izvršiti i kod embrija u stadiju morule i u stadiju blastociste (Kahraman *i sur.*, 2015).

6.2 SNP mikročipovi

Polimorfizmi jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) su razlike u jednom nukleotidu na istom položaju unutar molekule DNA koji se pojavljuju unutar populacije s učestalošću jednakoj ili većoj od 1%. Uzrok polimorfizma može biti transverzija ili tranzicija nukleotida. Postoji otprilike 1 SNP na 1000 baza u ljudskom genomu, odnosno ukupno oko 3×10^6 . Danas su SNP-ovi biološki markeri treće generacije koji omogućavaju, između ostalog, povezivanje gena s određenom bolesti te se primjenjuju u SNP mikročip testovima. Prije samog testa, potrebno je pripremiti uzorak, izolirati testnu DNA, amplificirati je uz pomoć PCR reakcije te fluorescentno obilježiti. Zatim se testna DNA hibridizira s posebno sintetiziranim probama (DNA sekvence; oligonukleotidi) (slika 5). Imobilizirani oligonukleotidi postavljeni su u velikoj gustoći na stakleni nosač te predstavljaju mikročip. Na površini od 1 cm^2 čipa može se postaviti ukupno 4×10^5 molekula DNA. Nakon hibridizacije i ispiranja fragmenata koji nisu čvrsto vezani zbog nepotpune komplementarnosti, skeniraju se fluorescencijski signali (<https://www.cd-genomics.com/the-principles-and-workflow-of-snp-microarray.html>). Intenzitet signala interpretira se kao mjera zastupljenosti i aktivnosti različitih gena, a ovisi o količini i afinitetu vezanja ciljne DNA (LaFramboise, 2009). Zbog svoje stabilnosti i zastupljenosti u genomu SNP-ovi su izvrsna podloga za cjelogenomsko pretraživanje visoke rezolucije. Omogućuju detekciju kromosomskih aberacija (trisomije, monosomije i delecije), a eliminacija embrija s takvim kromosomima može povećati uspješnost implantacije i smanjiti stopu spontanih pobačaja (Kahraman, 2015). SNP mikročipovi se koriste u dijagnosticiranju aneuploidije stanica s visokom preciznošću. Za razliku od FISH metode, ova metoda je tehnički manje zahtjevana, analiza se provodi računalno te je podložna automatizaciji što osigurava učinkovitost pri detekciji aneuploidija u stanicama blastociste i polarnog tijela (Treff *i sur.*, 2010). Za dijagnostiku defekata jednog gena (engl. *Single Gene Defect*, SGD), danas je popularno SNP genotopiziranje čitavog parentalnog genoma. Na taj

način mogu se detektirati bilo koji defektni parentalni geni, kao i kromosomske abnormalnosti, primjerice trisomije mejotičkog podrijetla, gdje se mogu uočiti oba haplotipa jednog roditelja i monosomije, gdje se može zamijetiti samo jedan haplotip) (Natesan *i sur.*, 2014).



Slika 5. Prikaz fiksiranih probi na čipu i testne DNA; potpuno komplementarni lanci čvrsto su vezani, dok su oni djelomično vezani slabije i isperu se (preuzeto i prilagođeno od <https://www.cd-genomics.com/the-principles-and-workflow-of-snp-microarray.html>).

6.3 qPCR

Kao poboljšanje klasične lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) koja se preko 20 godina koristi u detekciji pacijenata s rizicima za prijenos monogenских poremećaja, osmišljena je njena kvantitativna verzija (engl. *quantitative PCR*, qPCR) ili PCR u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*, RT-PCR). Kod kvantitativnog PCR-a nakon svakog ciklusa mjeri se fluorescentni signal čiji intenzitet predstavlja trenutnu količinu DNA u uzorku. Ciklus u kojem se akumulira toliko amplificiranog produkta da intenzitet postane dovoljno jak da se može detektirati označava se C_q (engl. *quantitation cycle*). Vrijednost C_q najviše ovisi o početnoj količini kalupa DNA prisutnoj u uzorku te joj je proporcionalna. Iščitava se iz eksponencijalne faze kalibracijske krivulje ovisnosti intenziteta fluorescencije o broju ciklusa. Umnoženi DNA fragmenti mogu se vizualizirati pomoću nespecifične fluorescentne boje (SYBR® Green) ili fluorescentno obilježenim oligonukleotidima (najčešće TaqMan® probe) (Kralik *i sur.*, 2017). SYBR® Green boja fluorescira znatno jače kada je vezana za mali utor dvolančane DNA, odnosno za PCR produkt te se zbog toga može koristiti za mjerenje količine amplificirane DNA. Za vizualizaciju

amplifikacije mogu se dizajnirati i posebne probe, a najčešće se koristi TaqMan®. Fluorescencija nastaje prilikom 5'-3' loma fluorescentno obilježene, mjesno specifične probe na čijem se 5' kraju nalazi fluorofor koji služi kao reporter, a na 3' kraju molekula koja apsorbira fluorescenciju koju emitira reporter, a pri tom ne emitira energiju (engl. *quencher*) (<https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/qpcr-and-rt-qpcr/probe-based-qpcr-and-rt-qpcr>). Budući da su prostorno dovoljno blizu, zbog neradijativnog transfera energije (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) s donorske molekule (fluorofor) na akceptorsku molekulu (molekula *quencher*), dolazi do smanjenja fluorescencije donora, odnosno emisija fluorofora nije vidljiva dok oligonukleotidna proba nije pocijepana (<https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-fluorescence-resonance-energy-transfer-fret-technology-and-its-application-in-bioscience/>). Kada se proba hidrolizira pomoću 5' - 3' endonukleazne domene Taq DNA polimeraze kada dolazi i do produživanja početnica, fluorescencija fluorofora se povećava jer se udalji od *quencher* molekule. Prema tome, porast fluorescencije reportera proporcionalan je amplifikaciji DNA (<https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/qpcr-and-rt-qpcr/probe-based-qpcr-and-rt-qpcr>).

Metoda qPCR, osim za kvantifikaciju DNA u uzorku, koristi se i za mjerenje genske ekspresije. Pomoću reverzne transkriptaze mRNA željenog gena prevede se u cDNA (engl. complementary DNA, komplementarna DNA) koja se onda kvantificira pomoću qPCR-a (Taniguchi *i sur.*, 2009).

Različite metode imaju svoje prednosti i mane s obzirom na cijenu, rezoluciju te vrijeme obrade rezultata. Metode aCGH i SNP mikročip temelje se na amplifikaciji cjelogenomske DNA iz biopsija stanica embrija te njihovoj hibridizaciji s tisućama DNA probi, nakon čega se hibridizacijski signali uspoređuju sa signalima euploidnih stanica. aCGH se široko koristi u medicini, ali ima ograničenu primjenu u otkrivanju mozaicizama niske razine. SNP mikročipovi su skupi, ali su pogodni za otkrivanje različitog spektra aneuploidija; primjerice mogu identificirati uniparentalne disomije i segmentalne greške, kao i od kojeg roditelja dolazi određena kopija kromosoma. qPCR ne zahtijeva cjelogenomsku amplifikaciju i zbog toga zaobilazi problem delecije gena. Također, ima vrlo brzo vrijeme obrade rezultata, no ne može otkriti subkromosomalne abnormalnosti radi nedostatka specifičnih markera. NGS je vrlo osjetljiv na mozaicizme niske razine, ali je vrlo skup (McCoy, 2017).

7. LITERATURA

- Abyholm, T. i Tanbo, T. (1993) GIFT, ZIFT, and related techniques. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 5(5), 615–622.
- Aboulghar, M., Baird, D. T., Collins, J., Evers, J. L. H., Fauser, B. C. J. M., Lambalk, C. B., Somigliana, E., Sunde, A., Tarlatzis, B., Crosignani, P. G., Devroey, P., Diczfalusy, E., Diedrich, K., Fraser, L., Geraedts, J. P. M., Gianaroli, L., Glasier, A., Van Steirteghem, A. (2009) Intrauterine insemination. *Human Reproduction Update*, 15(3), 265-277.
- Barbash-Hazan, S., Frumkin, T., Malcov, M., Yaron, Y., Cohen, T., Azem, F., Amit, A., Ben-Yosef, D. (2009) Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertility and sterility*, 92(3), 890–896.
- Bolton, H., Graham, S. J. L., Van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Gallardo, E. F., Voet, T., Zernicka-Goetz, M. (2016) Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, 1–12.
- Dević Pavlič, S. (2017) Ekspresijski profil AMH, AMHR2, FSHR i AR gena humanih stanica kumulusa u predviđanju fertilizacijskog potencijala jajne stanice. Doktorska disertacija. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju.
- Devroey, P., Van Steirteghem, A. (2004) A review of ten years experience of ICSI. *Human Reproduction Update*, 10(1), 19–28.
- Gajecka, M. (2016) Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Molecular genetics and genomics*, 291(2), 513–530.
- Hardarson, T., Caisander, G., Sjögren, A., Hanson, C., Hamberger, L., Lundin, K. (2003) A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Human reproduction*, 18(2), 399–407.
- Huang, J. Y., Rosenwaks, Z. (2014) Assisted reproductive techniques. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1154, 171–231.

- Kahraman, S., Beyazyürek, C., Taç, H. A., Pirkevi, C., Cetinkaya, M., Gülüm, N. (2015) Recent advances in preimplantation genetic diagnosis. *Advances in Genomics and Genetics*, 5, 189-203.
- Kakourou, G., Jaroudi, S., Tulay, P., Heath, C., Serhal, P., Harper, J. C., SenGupta, S. B. (2013) Investigation of gene expression profiles before and after embryonic genome activation and assessment of functional pathways at the human metaphase II oocyte and blastocyst stage. *Fertility and Sterility*, 99(3), 803-814.
- Kralik, P., Ricchi, M. (2017) A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(108).
- McCoy, R.C., Demko, Z.P., Ryan, A., Banjevic, M., Hill, M. Sigurjonsson, S., Rabinowitz, M. Petrov, D.A. (2015) Evidence of Selection against Complex Mitotic-Origin Aneuploidy during Preimplantation Development. *Plos Genetics*, 11(10).
- LaFramboise, T. (2009) Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*, 37(13), 4181–4193.
- Lubis P. H., Halim, B. (2018) Human Blastocyst Formation and Development. *Embryology - Theory and Practice*, 1-15.
- Magli, M. C., Jones, G., Lundin, K., Van den Abbeel, E. (2012) Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos. *Human Reproduction*, 27(1), 171-191.
- McCoy, R. C. (2017) Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. *Trends in genetics*, 33(7), 448–463.
- Munné, S., Blazek, J., Large, M., Martinez-Ortiz, P. A., Nisson, H., Liu, E., Tarozzi, N., Borini, A., Becker, A., Zhang, J., Maxwell, S., Grifo, J., Babariya, D., Wells, D.,Fragouli, E. (2017) Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertility and Sterility*, 108(1), 62–71.
- Munné, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Márquez, C., Cohen, J. (2002) Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reproductive Biomedicine Online*, 4(3), 223–232.

- Natesan, S. A., Bladon, A. J., Coskun, S., Qubbaj, W., Prates, R., Munne, S., Coonen, E., Dreesen, J. C., Stevens, S. J., Paulussen, A. D., Stock-Myer, S. E., Wilton, L. J., Jaroudi, S., Wells, D., Brown, A. P., Handyside, A. H. (2014) Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genetics in medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 16(11), 838–845.
- Santos Filho, E., Noble, J. A., Poli, M., Griffiths T., Emerson, G., Wells, D. (2012) A method for semi-automatic grading of human blastocyst microscope images. *Human Reproduction*, 27(9), 2641–2648.
- Saragusty, J., Arav, A. (2011) Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Society for Reproduction and Fertility*, 141(1), 1-19.
- Syrkasheva, A. G., Dolgushina, N. V., Romanov, A. Y., Burmenskaya, O. V., Makarova, N. P., Ibragimova, E. O., Kalinina, E. A., Sukhikh, G. T. (2017) Cell and genetic predictors of human blastocyst hatching success in assisted reproduction. *Zygote*, 25(5), 631-636.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. (2002) Minireview: Functions of the *cumulus oophorus* during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 414-424.
- Taniguchi, K., Kajiyama, T., Kambara, H. (2009) Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR. *Nature Methods*, 6, 503-506.
- Tarlatzis, B.C., Fauser, B.C., Kolibianakis, E.M., Diedrich, K., Devroey, P. (2006) On Behalf of the Brussels GnRH Antagonist Consensus Workshop Group, GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update*, 12(4), 333–340.
- Theisen, A. (2008) Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education*, 1(1), 45.
- Treff, N. R., Su, J., Tao, X., Levy, B., Scott Jr., R. T. (2010) Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertility and Sterility*, 94(6), 2017–2021.
- Truong, T. T., Gardner, D. K. (2020) Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. *Human reproduction*, 35(1), 12–23.

Tyler, M. S. (2000) *Developmental Biology: A Guide for Experimental Study*. Treće izdanje. Massachusetts: Sinauer Associates.

Valojerdi, M. R., Eftekhari-Yazdi, P., Karimiran, L., Hassani, F., Movaghar, B. (2009) Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26, 347-354.

Izvori s interneta

CD genomics. The Genomics Services Company. Dostupno na: <https://www.cd-genomics.com/the-principles-and-workflow-of-snp-microarray.html> [Pristupljeno: 10.8.2020.]

Held, P. (2012) An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience, 1–6. Dostupno na: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-fluorescence-resonance-energy-transfer-fret-technology-and-its-application-in-bioscience/> [Pristupljeno: 10.8.2020.]

New England BioLabs®. Dostupno na: <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/qpcr-and-rt-qpcr/probe-based-qpcr-and-rt-qpcr> [Pristupljeno: 10.8.2020.]

8. SAŽETAK

Potpomognuta oplodnja specijalizirana je grana medicine čiji je konačni cilj oplodnja jajne stanice, implantacija embrija i razvitak trudnoće. Iako je sama osnova metoda potpomognute oplodnje ostala ista, nova otkrića uvelike pomažu povećanju njihove uspješnosti. Najčešći postupci potpomognute oplodnje su *in vitro* fertilizacija i intracitoplazmatska injekcija spermija. Od velikog je značaja poznavanje morfologije i fiziologije jajne stanice koja ima ključnu ulogu u samom procesu oplodnje. Veliki napredak predstavlja usavršavanje sastava hranidbene podloge za jajnu stanicu i sami embrij. Zbog toga je važno poznavanje njihovog metabolizma, odnosno ekspresije gena. Također, za veliki udio spontanih pobačaja odgovorno je neuspješno oslobađanje embrija iz ZP, zbog čega se provode istraživanja čimbenika koji utječu na taj proces. Važan dio potpomognute oplodnje je i krioprezervacija; dugotrajna pohrana embrija ili jajnih stanica vitifikacijom (naglim smrzavanjem) pri čemu dolazi do osmotskog stresa koji može biti ublažen raznim antioksidansima. Ponekad se parovi odlučuju za potpomognutu oplodnju ukoliko postoji velika vjerojatnost nasljeđivanja neke genske bolesti, pri čemu glavnu ulogu ima preimplantacijska genska dijagnostika. Ona obuhvaća razne novorazvijene metode od kojih su najčešće komparativna genomna hibridizacija na čipu, SNP mikročipovi, kvantitativna lančana reakcija polimeraze i sekvenciranje sljedeće generacije. Novija istraživanja pokazala su veću stopu uspješnosti ukoliko je biopsija izvršena na embriju u stadiju blastociste umjesto morule. Svrha preimplantacijske genetske dijagnostike je probiranje normalnih, zdravih embrija koji će biti transferirani u maternicu ili pohranjeni krioprezervacijom. Na taj način moguće je detektirati mozaicam (prisutnost dviju ili više staničnih linija s različitim brojem kromosoma), monogenske poremećaje, poliploidiju, aneuploidiju, delecije, duplikacije, translokacije i druge kromosomske abnormalnosti te mjeriti gensku ekspresiju.

9. SUMMARY

Assisted reproductive technology (ART) is a specialized medicine branch whose final aim is the oocyte fertilization, embryo implantation and pregnancy development. Although the basis of ART has remained the same, new discoveries greatly enhance their success rate. The most common methods used in ART are *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The comprehension of oocyte morphology and physiology is of the great importance because the oocyte has a key role in the process of fertilization. The resounding advance was the specialization of the nutrient medium composition for the oocyte and the embryo. Because of that, it is important to understand their metabolism and their gene expression, respectively. Also, the unsuccessful releasement of embryo from *zona pellucida* is responsible for large quantity of miscarriages, thus there are numerous studies underway, investigating factors that affect that process. The important part of ART also includes criopreservation; the long-term embryo or oocyte conservation via vitrification (rapid cooling) where osmotic stress ensues, but which can be alleviated by various antioxidants. Sometimes the couples opt for ART if there is a high chance in genetic disease inheritance, where preimplantation genetic diagnostics (PGD) plays a major role. It includes newly developed methods, of which the most common are: array-based comparative genomic hybridization (aCGH), SNP microarray, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and next generation sequencing (NGS). Recent researches have shown a bigger success rate if the biopsy is done on blastocyst embryo stage rather than morula stage. The purpose of PGD is to probe the normal, healthy embryos which will be transferred into the uterus or stored by cryopreservation. In that way it is possible to detect mosaicism (existence of two or more cell lines with different chromosome number), monogenic disorders, polyploidies, aneuploidies, deletions, duplications, translocations and other chromosome abnormalities, and to measure gene expression.