

**UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**

**OBȚINEREA ȘI CULTIVAREA EMBRIONILOR UMANI “IN VITRO”. STUDII
STRUCTURALE ȘI ULTRASTRUCTURALE.**

Rezumat al tezei de doctorat

**Conducător științific
Prof.Dr.Constantin Crăciun**

**Doctorand
Delia Checiu**

**CLUJ-NAPOCA
2010**

Cuprins:

Introducere	pg. 3
Obiective	pg. 3
Materiale si metode	pg.4
Rezultate privind calitatea materialului biologic masculin-calitatea spermei	pg. 10
Rezultate privind calitatea materialului biologic feminin-calitatea ovocitelor	pg. 12
Rezultate privind studiile ultrastructurale asupra materialului biologic	pg.15
Studii privind ultrastructura materialului biologic masculin	pg. 15
Studii pe material seminal	pg.15
Studii ale materialului biologic masculin pe ovocite premature nefecundate	pg. 21
Concluzii asupra spermilor	pg. 25
Studii privind ultrastructura materialului biologic feminin	pg. 26
Ovocite mature	pg. 26
Ovocite premature	pg. 33
Ovocite postmature	pg. 37
Ovocite mature nefecundate	pg. 41
Maturare in vitro a ovocitelor premature	pg.44
Concluzii asupra ovocitelor	pg.47
Concluzii finale	pg.48
Bibliografie selectiva	pg.50

Cuvinte cheie: : Fecundatie in vitro, ultrastructura, ovocite, spermii, embrioni, ovocite premature, ovocite mature, ovocite postmature.

Introducere

Deși pare surprinzător, în reproducerea umană, în mod natural, există mai mult insucces decât succes, atât din cauze naturale cât și din cauza unor influențe exogene.

Fecundația în vitro (FIV), deși are o rată de succes, la prima vedere modestă, (25-30%) este totuși o modalitate de rezolvare pentru multe dintre astfel de cupluri.

Pentru embriolog ținta majoră o reprezintă obținerea unor embrioni de o foarte bună calitate, cu șanse mari de implantare și de instalare a unei sarcini. Obținerea unor astfel de embrioni ține atât de cauze cunoscute cât și de cauze necunoscute.

Pornind de la aceste premise am considerat că noi investigații cu privire la ultrastructura spermilor, a ovocitelor recoltate, a embrionilor obținuți, ar putea aduce date noi cu privire la calitatea lor, date care să ofere sugestii pentru îmbunătățirea tehnicilor de stimulare ovariană, de prelucrare a spermei, de realizare a fecundației și de cultivare a embrionilor.

Credem că orice mic pas înainte, care să conducă în final la nașterea, în plus, chiar și a unui singur copil, reprezintă pentru noi un obiectiv important.

Investigațiile s-au derulat pe un număr mai mare de ani pentru că materialul pe care l-am avut la dispoziție (ovocite, embrioni), a fost folosit pentru investigații numai după acordul cuplurilor, acord care de multe ori a fost greu de obținut.

Premize:

De-a lungul timpului, în decursul aplicării procedurii FIV, atât pe baza bibliografiei în domeniu, cât și pe baza observațiilor făcute în activitatea proprie de 10 ani, ne-au determinat să ne propunem să facem investigații cu privire la următoarele situații:

1. Spermii menținute 24 de ore în mediu de cultură și-au păstrat caracteristicile inițiale cu privire la mobilitate și aspect și totuși dacă ele au fost puse împreună cu ovocite proaspăt recoltate, nu au fost capabile să realizeze fecundația.

2. La recoltarea ovocitelor se obțin ovocite cu grade diferite de maturitate: mature, premature și postmature. Pentru fecundație sunt preferate ovocitele mature, deoarece ovocitele premature nu se fecundează. Ele însă se pot matura *in vitro* dacă sunt menținute 24 de ore în mediu de cultură și apoi ele devin fecundabile.

Obiective:

Ne-am propus ca prin investigații la nivel ultrastructural asupra spermilor care au fost menținute 24 de ore în mediu de cultură, să ne explicăm acel comportament amintit anterior, prin analiza calității integrității morfostructurale.

Am considerat că un studiu structural și ultrastructural, amplu, comparativ, asupra celor 3 tipuri de ovocite ne poate furniza elemente noi pentru a ne explica de ce ovocitele premature nu sunt fecundabile. Menționăm faptul că în literatura de specialitate nu există studii ultrastructurale, comparative, privitoare la cele două situații menționate mai sus.

Materiale și metode:

Materialul biologic, spermii și ovocite umane, a fost obținut după informarea pacienților și după acordarea de către aceștia al acordului scris, în conformitate cu normele etice.

Materialul biologic masculin este reprezentat de spermii. Proba de spermă necesară realizării fecundației ovocitelor *in vitro* se recomandă a fi recoltată cu maxim 30 de minute înainte de folosirea ei, prin masturbare.

În mod natural, spermii se separă de lichidul seminal la nivelul tractului genital feminin. Cercetările efectuate au arătat că în lichidul seminal există factori care inhibă capacitatea (Yanagimachi 1994), că expunerea prelungită a spermilor la lichidul seminal le inhibă capacitatea acestora de a suferi reacția acrozomială *in vitro* (Rogers și colab. 1983) și scade capacitatea spermilor de a fecunda (Kanwar și colab. 1979). Luând în considerare toți acești factori, în cadrul tehnicilor de reproducere asistată, în cadrul laboratorului nostru am trecut la separarea rapidă a spermilor de lichidul seminal. Metoda de prelucrare pe care am folosit-o, a fost metoda swim-up.

Pe parcursul anilor am modificat tehnica clasică swim-up, din punct de vedere al numărului de centrifugări, a cantității de mediu de cultură ce trebuie adăugat peste pellet după ultima centrifugare, cât și din punct de vedere al timpului petrecut în incubator, necesar separării spermilor capabile de a realiza fecundația. În funcție de experiența embriologului și de particularitățile fiecărei probe (timp de fluidificare, număr de spermii mobile și felul mobilității), fiecare din parametri amintiți anterior au fost modificați pentru obținerea unui rezultat maxim din punct de vedere al selectării a cât mai multe spermii bine mobile (100%).

Materialul biologic feminin este reprezentat de ovocite, recoltate prin puncție foliculară, realizată transvaginal, sub control ecografic.

După încheierea puncției, ovocitele sunt analizate la stereomicroscop și la microscopul optic, inversat, cu contrast de fază, la mărire de 200x sau 400x, pentru stabilirea gradului de maturitate.

Cel mai important argument pentru efectuarea clasificării ovocitelor, este stabilirea corectă a gradului de maturare al ovocitelor în momentul realizării inseminării acestora, pentru obținerea unui procent de fecundație cât mai mare.

După Rabe (2000) clasificarea ovocitelor în funcție de gradul de maturitate se face împărțind ovocitele în 3 categorii:

1. Ovocite mature: citoplasma este clară, primul glob polar poate fi vizibil, celulele din cumulus au o densitate celulară moderată cu o răspândire relativ uniformă în masa gelatinoasă a cumulusului; coroana radiată are celule foliculare dispuse, mai mult sau mai puțin radiar în jurul ovocitului îmbrăcând un aspect tipic, identificabil la stereomicroscop și la microscopul optic
2. Ovocite postmature: citoplasma și zona pellucida sunt slab vizibile, cumulusul oophorus și corona radiată prezintă o densitate celulară mărită.
3. Ovocite imature: ovocitul este greu vizibil deoarece cumulusul oophorus prezintă o densitate celulară mare și agregate celulare, iar celulele coronei radiată sunt foarte dense.

În cadrul laboratorului nostru, am folosit sistemul de clasificare a ovocitelor în funcție de gradul de maturitate propus de Rabe (2000) (fig. 1,2,3,)

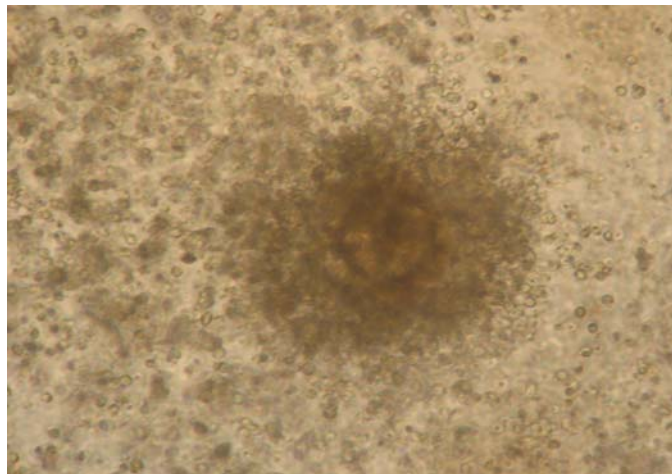


Fig.1 Ovocit prematur (original).

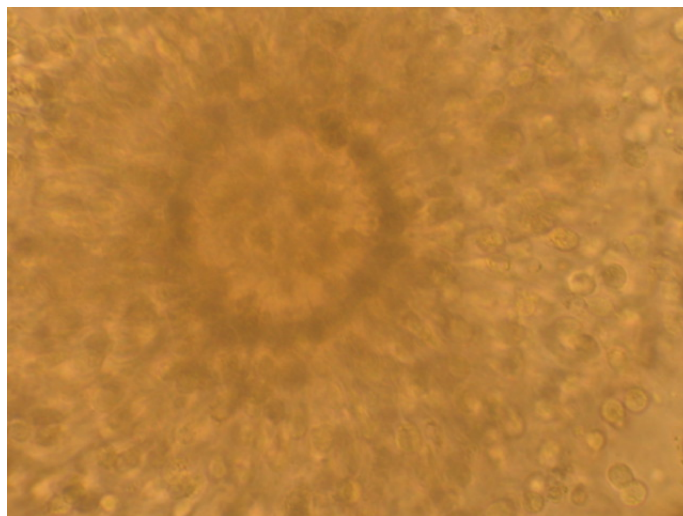


Fig.2 Ovocit matur (original).

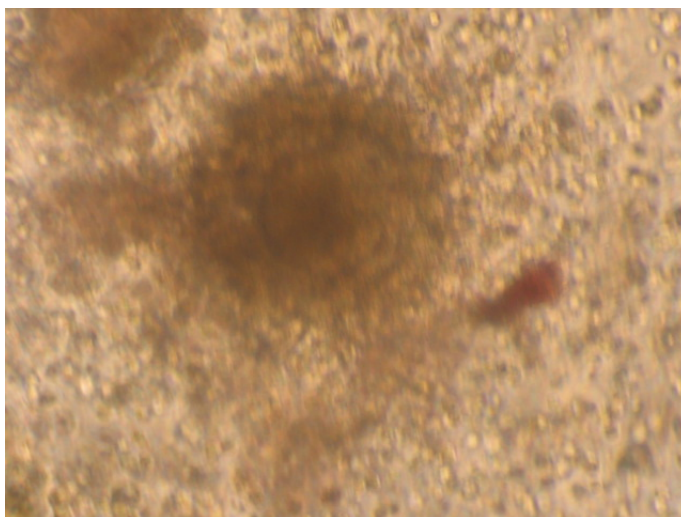


Fig.3 Ovocit postmatur (original).

La ovocitele mature am realizat inseminarea la 2 ore după punctia foliculară, iar cele post-mature le-am inseminat la maxim 30 minute după terminarea puncției foliculare. Ovocitele imature le-am cultivat pentru 24 ore *in vitro* pentru maturare și abia apoi s-a făcut inseminarea.

Numărul de spermii recomandat pentru efectuarea inseminării ovocitelor este de 100.000 spermii 100% bine mobile/godeu.

Controlul fecundației s-a efectuat în cadrul laboratorului nostru, ca regulă, la 16 ore după realizarea inseminării. Ovocitul fecundat prezintă 2 pronuclei. Prezența pronucleilor reprezintă primul semn vizibil al fecundației, ambii pronuclei trebuie să apară simultan și în poziție aliniată. (fig.4)

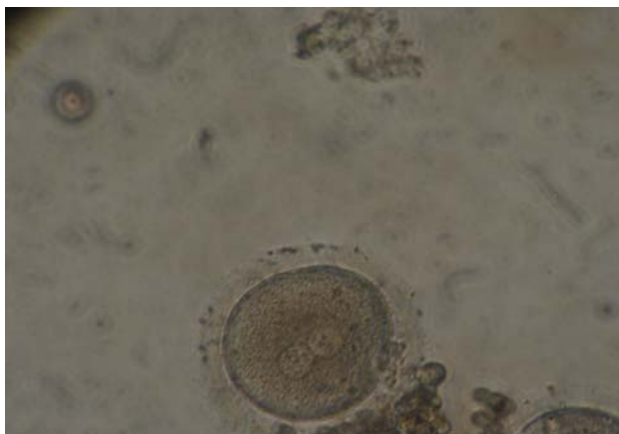


Fig.4 . Ovocit uman în stadiul de 2 pronuclei (original)

Embrionii umani de calitate bună, obținuți *in vitro*, prin tehnicile de reproducere asistată, reprezintă unul dintre scopurile principale ale metodelor de cultivare *in vitro*. În ultimii ani, tehnicile de reproducere asistată s-au dezvoltat foarte mult, astfel încât aproape

toate formele de patologie se pot corecta și rezolva, mai puțin una: calitatea ovocitelor. Prin calitatea ovocitelor înțelegem capacitatea acestora de a forma embrioni viabili, capabili de implantare și de a da naștere unui copil. Cu toate că, pe măsură ce știința progresează, se îmbunătățesc protocoalele de stimulare ovariană, implicit calitatea ovocitelor, limitarea succesului procedeele de reproducere asistată constă, printre altele și în incapacitatea de a obține ovocite de calitate bună, respectiv embrioni de calitate bună.

În scopul evaluării embrionilor umani, noi am folosit sistemul de evaluare al embrionilor pus la punct de către Edwards (1995) la Bourn Hall Clinic Anglia care presupune clasificarea embrionilor în 6 categorii:

1. Embrioni gradul 1: Embrionii au blastomere egale, regulate, sferice, nu foarte închise la culoare, cu zona pellucida intactă. Embrionii de gradul 1 au foarte puține fragmentări, sau chiar deloc (mai puțin de 10%). Încadrarea embrionilor în fiecare grupă este un subiect de dispută deoarece aici intervine experiența și subiectivitatea embriologului. Numărul de blastomere este de asemenea important, și trebuie să fie conform standardului.
2. Embrioni gradul 2: Embrionii au blastomere inegale sau de formă neregulată, iar fragmentările sunt sub 50%.
3. Embrioni gradul 3: Embrionii prezintă fragmentări în procent de 50%. Restul blastomerele trebuie să fie cel puțin de gradul 2, iar zona pellucida este intactă.
4. Embrioni de gradul 4: Mai mult de 50% din blastomere sunt fragmentate, iar restul celulelor par a fi viabile.
5. Embrioni de gradul 5: Zigoți rămași în stadiul de 2PN.
6. Embrioni de gradul 6: Embrioni cu blastomere lizate, contractate sau foarte închise la culoare.

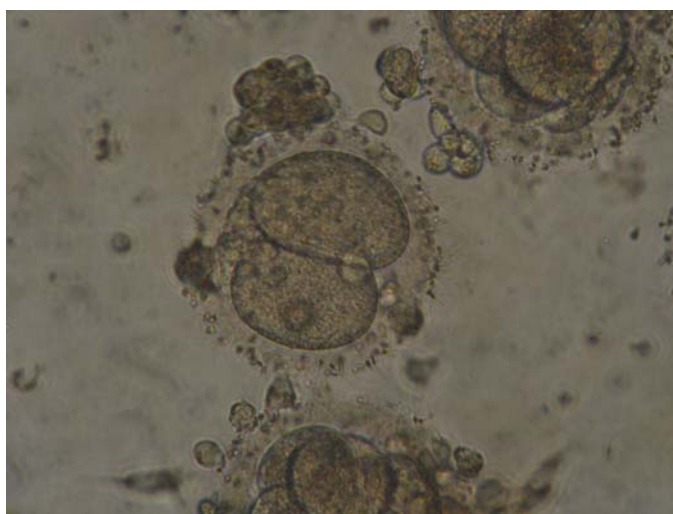


Fig.5 Embrion uman în stadiul de 2 celule (original).



Fig. 6 Embrion uman în stadiul de 3 celule (original).

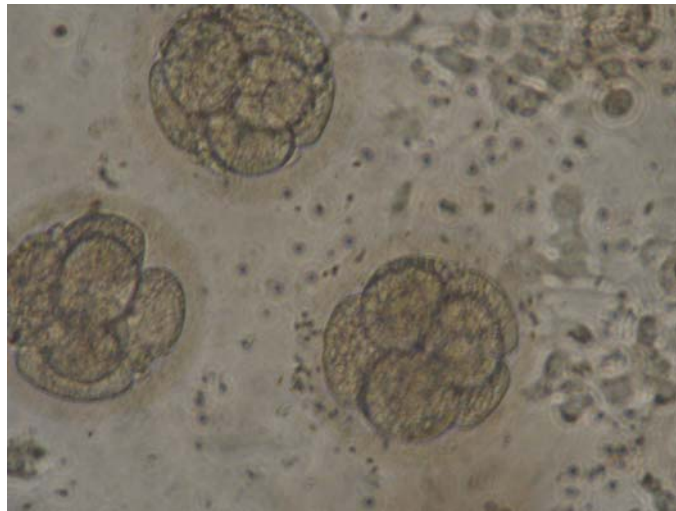


Fig.7 Embrioni umani în stadiul de 6 celule (original).

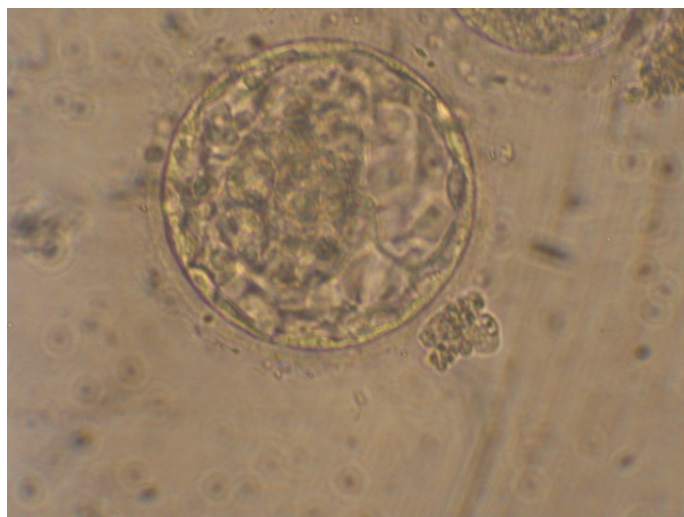


Fig.8 Blastocist uman incipient (original).

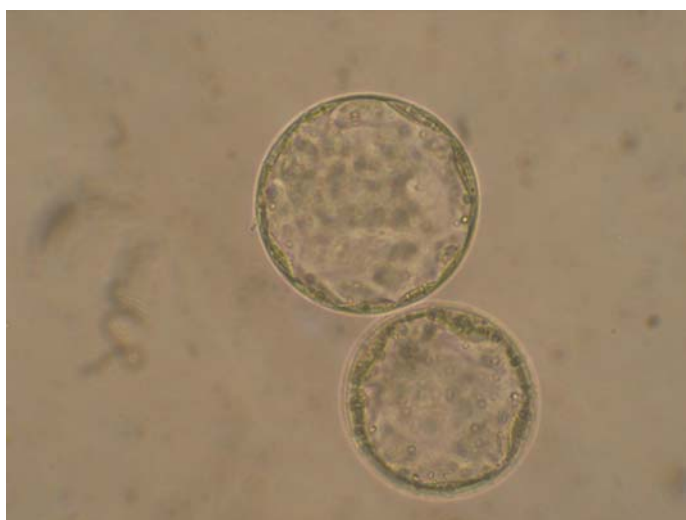


Fig.9. Blastocist expandat și eclozat (dreapta) (original).

Rezultate obținute privind calitatea materialului biologic masculin-calitatea spermei.

Pe parcursul celor 9 ani, am efectuat 5558 spermograme. Rezultatele obținute le-am analizat luând în considerare mai mulți parametri: vârsta pacienților, numărul de zile de abținere sexuală, număr de spermii/ml, procentul de spermii mobile, morfologia spermilor.

La împărțirea pe grupe în funcție de numărul spermilor, am luat în calcul valoarea de 5 mil/ml considerată de Bostofte și colab (1982) ca valoarea limită pentru realizarea fecundației *in vitro*.

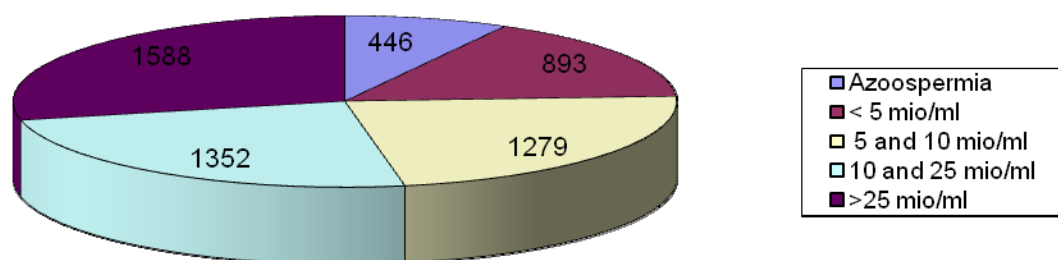
Din totalul de 5558 spermograme efectuate, răspândirea cazurilor în funcție de diagnostic este următoarea:

- azoospermie: 446 cazuri-**8.02%**,
- oligospermie: 3524 cazuri < 25 mil/ml –**63,39 %**,
 - defalcăt pe subgrupe situația este:
 - < 5 mil/ml: 893 cazuri-16.06% (oligospermie severă)
 - între 5 și 10 mil/ml: 1279 cazuri- 23.01%,
 - între 10 și 25 mil/ml: 1352 cazuri- 24.32%,
- normospermie: 1588 cazuri >25 mil/ml: - **28.59%**.

Grupe de diagnostic	azoospermie	oligospermie			normospermie
		3524 cazuri= 63,39%			1588 cazuri=28.59%
		<5mil/ml	Între 5 și 10mil/ml	Între 10 și 25 mil/ml	>25 mil/ml
Număr de cazuri	446 cazuri	893 cazuri	1279 cazuri	1352 cazuri	1588 cazuri
Procent	8.02%	16.06%	23.01%	24.32%	28.59%.

Tabel.1 Corelație între numărul de cazuri și grupele de diagnostic.

DISTRIBUTIA PE GRUPE DE DIAGNOSTIC



Grafic 1. Corelație între numărul de cazuri și grupele de diagnostic.

Analizând datele obținute remarcăm faptul că procentul de cazuri cu oligospermie reprezintă 63,39%, pe când cazurile de normospermie reprezintă doar 28,59%, ceea ce reprezintă o diferență semnificativă și care reprezintă un serios semnal de alarmă.

Dacă luăm împreună cazurile de azoospermie (8,02%) cu cele de oligospermie severă (16,06%) constatăm că numărul cazurilor cu probleme foarte serioase (24,08%) reprezintă un procent neașteptat de mare.

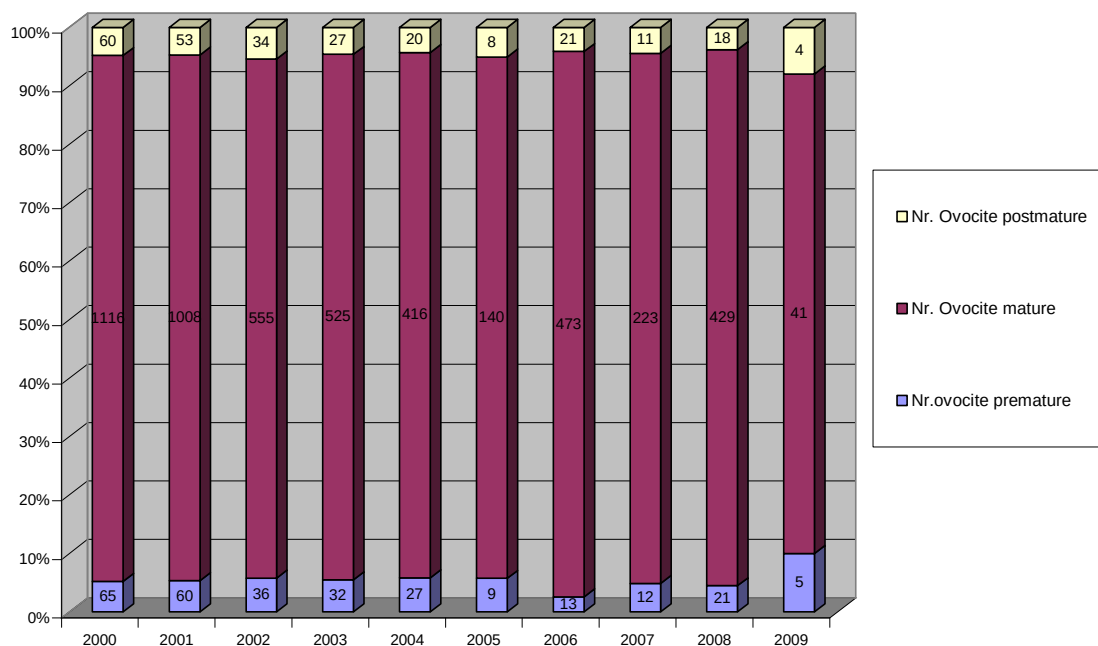
Rezultate privind calitatea materialului biologic feminin-calitatea ovocitelor.

În ceea ce privește tipurile de ovocite recoltate, acestea au fost împărțite în 3 grupe principale: premature, mature, postmature.

An	Nr.ovocite premature	Nr. Ovocite mature	Nr. Ovocite postmature
2000	65 (5,24%)	1116 (90%)	60 (4,76%)
2001	60 (5,35%)	1008 (89,9%)	53 (4,76%)
2002	36 (5,76%)	555 (88,80%)	34 (5,44%)
2003	32 (5,48%)	525 (90%)	27 (4,62%)
2004	27 (5,83%)	416 (89,95%)	20 (4,32%)
2005	9 (5,73%)	140 (89,18%)	8 (5,09%)
2006	13 (2,56%)	473 (93,30%)	21 (4,14%)
2007	12 (4,88%)	223 (90,65%)	11 (4,47%)
2008	21 (4,49%)	429 (91,67%)	18 (3,84%)
2009	5 (10%)	41 (82%)	4 (8%)
Total	280 (5,2%)	4926 (90,1%)	256 (4,7%)

Tabel. 2 Comparație între numărul de ovocite premature, mature și postmature obținute la punctiile foliculare (defalcate pe ani).

COMPARATIE INTRE NUMARUL DE OVOCITE PREMATURE, MATURE SI POSTMATURE OBTINUTE LA PUNCTIILE FOLICULARE



Grafic.2 Comparație între numărul de ovocite premature, mature și postmature obținute la punctiile foliculare (defalcate pe ani).

Constatăm că procentele obținute sunt similare cu cele din literatură (Yong și colaboratorii 1998).

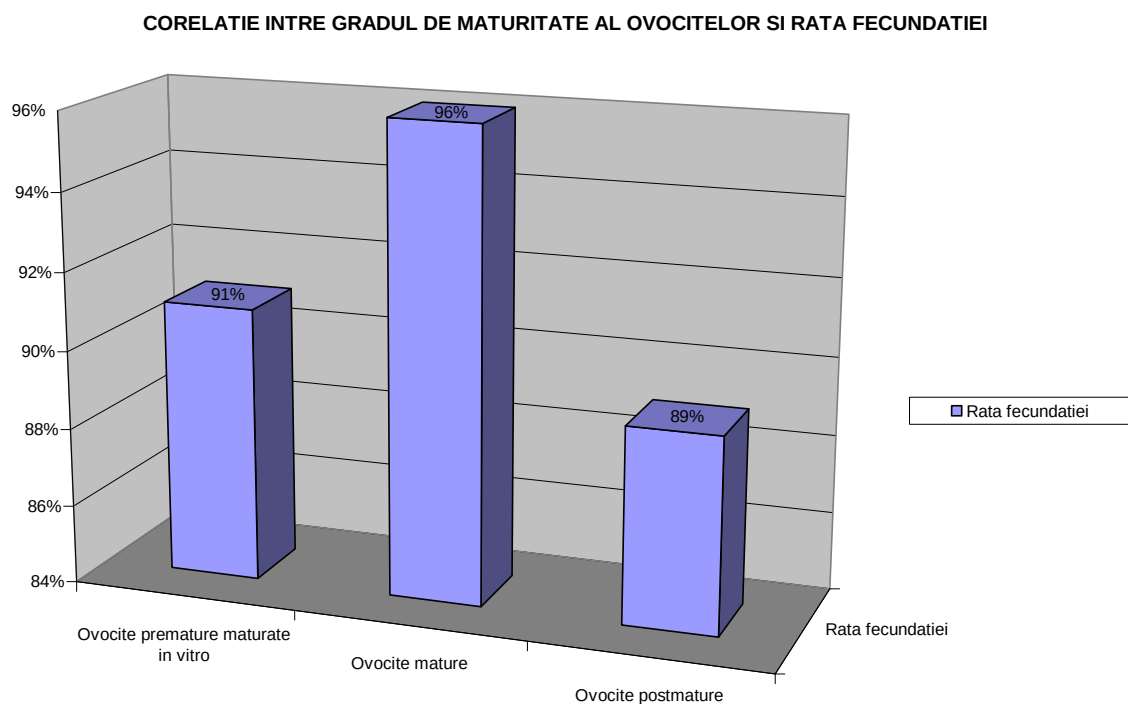
Rata de dezvoltare a embrionilor pe parcursul cultivării.

Dezvoltarea preimplantațională a embrionilor *in vitro* este influențată de numeroși factori. Compoziția mediilor de cultură, calitatea materialului biologic masculin, condițiile din cadrul laboratorului, respectarea tuturor măsurilor de igienă și de prevenire a infecțiilor, și nu în ultimul rând calitatea ovocitelor sunt factori care contribuie la obținerea de embrioni de calitate superioară. Calitatea ovocitelor poate fi modificată în sens pozitiv (dar și negativ) de stimularea ovariană, tipul de protocol și de medicație aleasă.

Din totalul ovocitelor obținute la punctiile foliculare efectuate în cadrul laboratorului nostru în perioada luată în studiu, 5462 de ovocite, 287 au fost premature, 4919 au fost mature iar 256 au fost postmature. Inseminarea ovocitelor s-a făcut la intervale de timp diferite, pentru ovocitele postmature, inseminarea a fost efectuată la maxim 30 de minute după recoltarea ovocitelor, iar pentru ovocitele mature am efectuat inseminarea la 2 ore după punctia foliculară. În cazul ovocitelor premature, conduita abordată de noi a fost cultivarea ovocitelor premature pentru 24 de ore, și după acest interval am trecut la inseminarea acestora. Rata fecundației a fost diferită. În cazul ovocitelor premature rata fecundației a fost de 91%, pentru cele mature a fost de 96% iar pentru cele postmature a fost de 89%, cu o medie de 92%.

Gradul de maturitate	Ovocyte premature	Ovocyte mature	Ovocyte postmature
Rata fecundației	91%	96%	89%

Tabel.3 Corelație între gradul de maturitate al ovocitelor și rata fecundației.



Grafic.3 Corelație între gradul de maturitate al ovocitelor și rata fecundației.

Rezultate privind studiile ultrastructurale asupra materialului biologic.

Studii privind ultrastructura materialului biologic masculin.

Studiile pe material seminal au avut drept scop studiul ultrastructural al spermilor *proaspăt recoltate*, comparativ cu aspectele ultrastructurale al spermilor aflate la anumite intervale de timp de la momentul recoltării lor:

- fixate imediat după prelucrarea necesară pentru adăugarea lor la mediul de cultură (metoda swim-up) în vederea realizării fecundației, (mediu în care în mod obișnuit, se află ovocitele);
- spermii care au petrecut în incubator, în mediu de cultură, în absența ovocitelor, anumite intervale de timp: 1,3,6,18 ore, pentru a vedea dacă, în absența ovocitelor, spermii capabile suferă modificări ultrastructurale.

Aceste investigații au fost sugerate de constatarea noastră că spermii care au petrecut 18-20 de ore (peste noapte) în mediul de cultură în absența ovocitelor, nu mai au capacitate fecundativă, dacă după acest interval sunt puse în mediu de cultură cu noi ovocite. Astfel de situații au apărut atunci când la recoltarea ovocitelor acestea erau premature și prin urmare a fost necesară maturarea lor în vitro, timp de 18-20 de ore. În astfel de situații s-a impus din nou recoltare de spermă proaspătă.

Pe de altă parte investigațiile privind ultrastructura diferitelor tipuri de ovocite, prezigoți, embrioni în diferite stadii de dezvoltare, au evidențiat prezența în zona lucidă a acestor stadii, a spermilor (cu care ovocitelor au fost în contact 18-20 de ore). Prin urmare și aceste aspecte au fost analizate.

Studii pe material seminal.

Imaginile obținute la probele cu spermii proaspete evidențiază aspectul tipic al unei spermii umane. Capul spermiei are forma tipică, pe unele imagini se văd câteva zone vacuolare în masa de cromatină nucleară condensată ce alcătuiește capul în cea mai mare parte a lui. Jumătatea anterioară a capului (de formă ascuțită) este acoperită de *acrozom* care are o densitate electronoptică mai mică decât capul spermiei. Acrozomul are o membrană acrozomială internă (înspre capul propriu-zis), matricea acrozomială și membrana acrozomială externă.

La baza capului în zona numită *gâtul spermiei* se observă foarte bine centriolul proximal de la care pornește *axonema* cozii. Prima regiune a cozii se numește *piesa intermediară* și este porțiunea primă a cozii, la care în jurul axonemei avem *teaca mitocondrială*. (fig.10)

Pe secțiune transversală la nivelul piesei intermediare se disting foarte bine plasmalema spermiei, stratul de citoplasmă, mitocondriile tecii, cele 9 condensări fibrilare, iar mai în interior se disting cele 9 dublete de microtubuli caracteristice structuri unui flagel (fig.14).



Fig. 10

Chiar și în cazurile de normospermie, pe lângă formele normale, am observat o impresionantă varietate de forme anormale, mobile și care la microscopul optic nu se văd.(fig.11, 12, 13)



Fig.11



Fig. 12

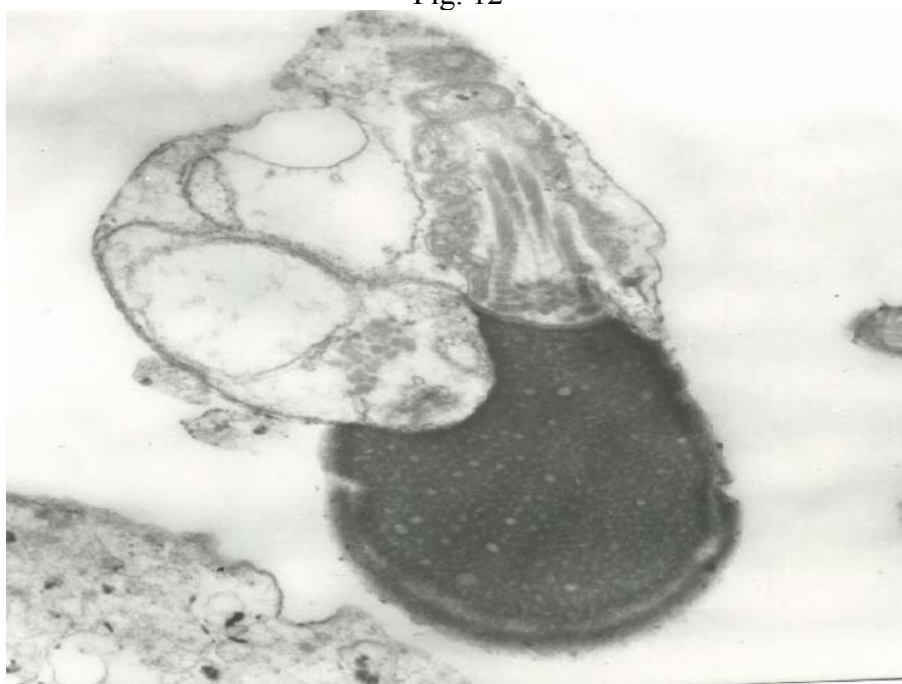


Fig.13

Observațiile făcute pe spermii fixate la 3 ore de incubație în mediu Ham-s F-10 evidențiază faptul că spermii au aspect ultrastructural normal.(fig.14)

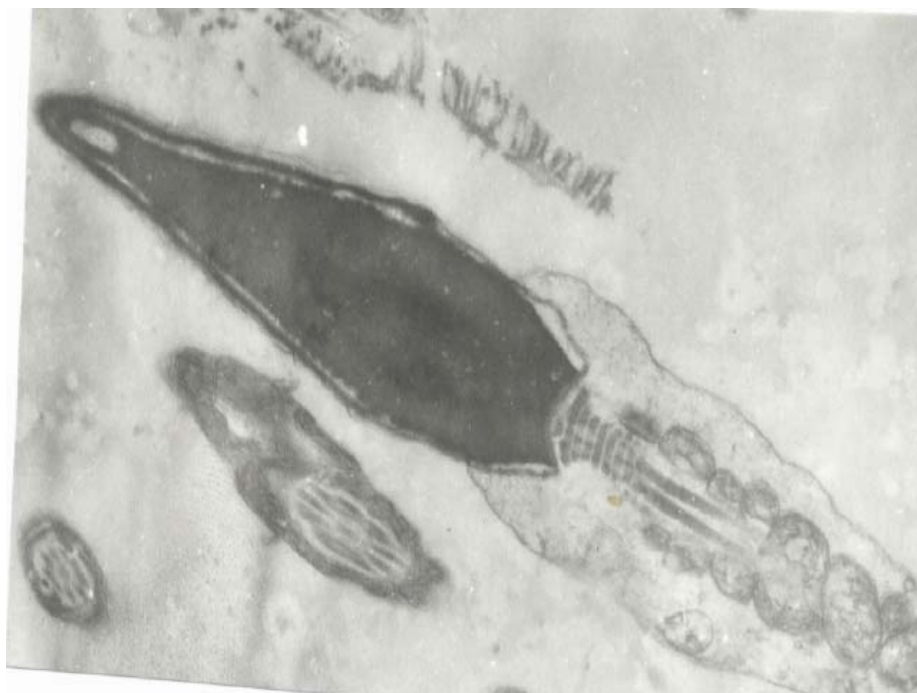


Fig.14

La 6 ore de incubație, mediul de cultură devine mai acid (se constată prin modificarea culorii mediului), probabil datorită eliberării unei cantități de hiluronidază din vezicula acrozomială și posibil și datorită apariției în mediu de specii reactive ale oxigenului. Aspectul ultrastructural al acestor spermii și mai ales al acrozomului este absolut normal.(fig.15).

La un procent relativ scăzut de spermii (10-15%) se observă dilatări și chiar rupturi ale plasmalemei spermilor.

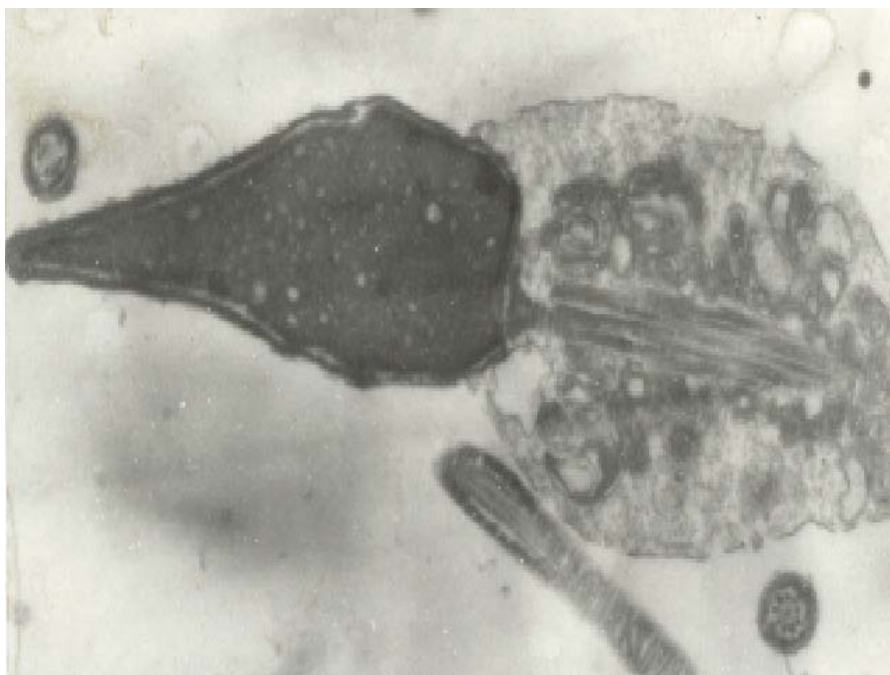


Fig.15

Modificări structurale semnificative au fost observate la spermii, după 18 ore de incubare în mediu de cultură. Astfel un număr însemnat de spermii (circa 30-40%) prezintă o dilatare a acrozomului, matricea acrozomială are un aspect electronoptic mai puțin dens și sunt prezente chiar vezicule în matricea acrozomială (fig.16).



Fig. 16

Se observă un număr mic de spermii la care capul are aspect mai pal, probabil, cromatina este mai decondesată, acrozomul mai dilatat, aspect ce poate fi interpretat că aceste spermii sunt probabil moarte. (fig.17).

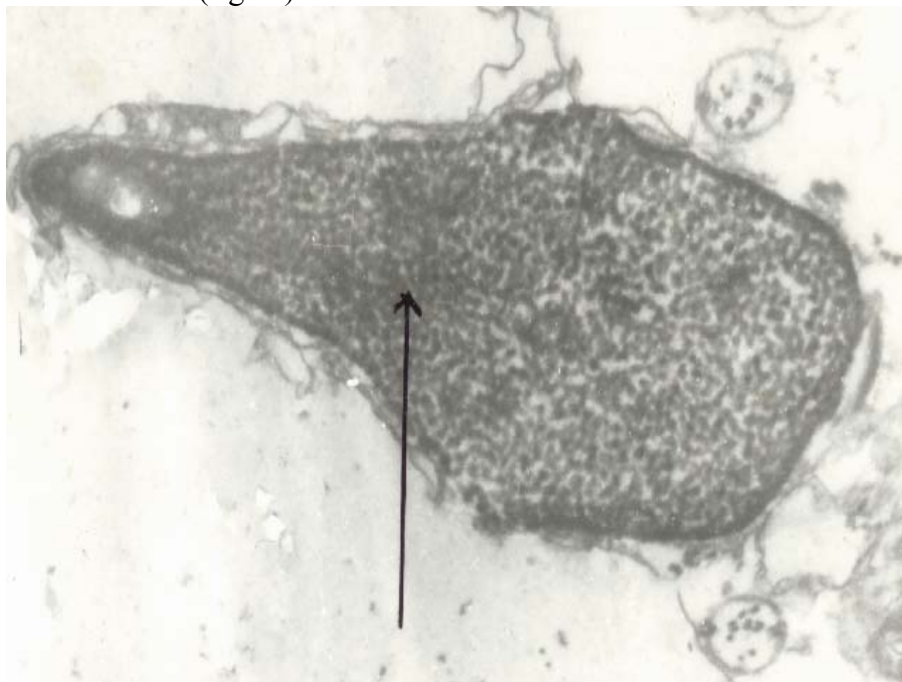


Fig. 17

Aspectul acrozomului la spermii incubate 18 ore în mediu de cultură, îl putem interpreta ca fiind cauza pentru care aceste spermii nu mai sunt capabile să fecundeze, deși ele sunt foarte mobile și aspectul lor la microscopul optic este absolut normal. Aceste spermii, prin prelucrarea inițială pentru swim-up, practic au fost capacitate.

Probabil că în timpul celor 18 ore petrecute în mediul de cultură, moleculele proteice de pe capul spermiei capabile să recunoască porțiuni specifice din lanțul carbohidrat al glicoproteinei de tip ZP3 (porțiunile terminale ce conțin galactoză) din zona pelucidă, suferă modificări care nu le mai permit să recunoască glicoproteina ZP3 și să realizeze legarea capului spermiei la zona pelucidă.

În acest context, aserțiunea din literatură potrivit căreia, *in vivo*, spermii își păstrează capacitatea fecundantă timp de cel puțin 24 ore în tractul genital feminin, pornind de la constatarea că spermii își păstrează mobilitatea, trebuie privită cu o anumită rezervă. Aceasta deoarece spermii care au ajuns în trompele uterine sunt deja capacitate încă din timpul petrecut în cavitatea uterină. Desigur că această interpretare are la bază constatările din *vitro* și este posibil ca *in vivo* condițiile din lichidul în care înoată spermii prin trompele uterine să aibă parametri biochimici adecvați, astfel încât să nu existe condițiile fizico-chimice nefavorabile pe care le întâlnim *in vitro* și care să inducă modificările ultrastructurale pe care le-am amintit mai sus.

Studii ale materialului biologic masculin pe ovocite premature nefecundate.

La majoritatea ovocitelor găsite, la controlul de la 18 ore după inseminare, ca fiind nefecundate, au fost observate spermii atașate la zona pelucidă. Pe preparatele de microscopie electronică am observat următoarele aspecte:

- spermii împlântate în zonă în cele mai multe cazuri sunt situate mai aproape de marginea externă a zonei (fig.18,19)

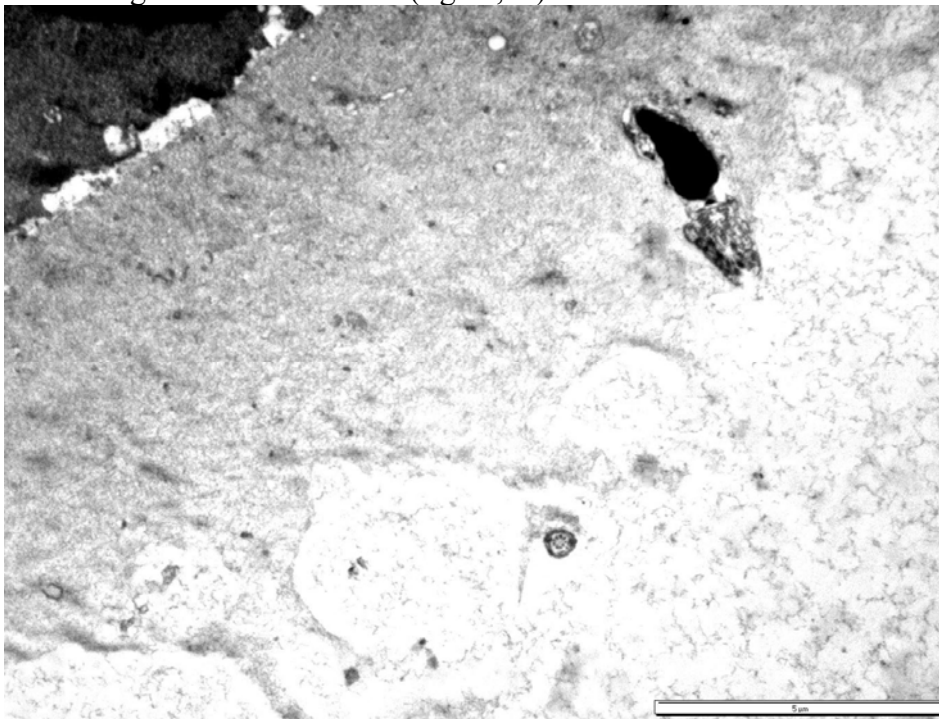


Fig. 18

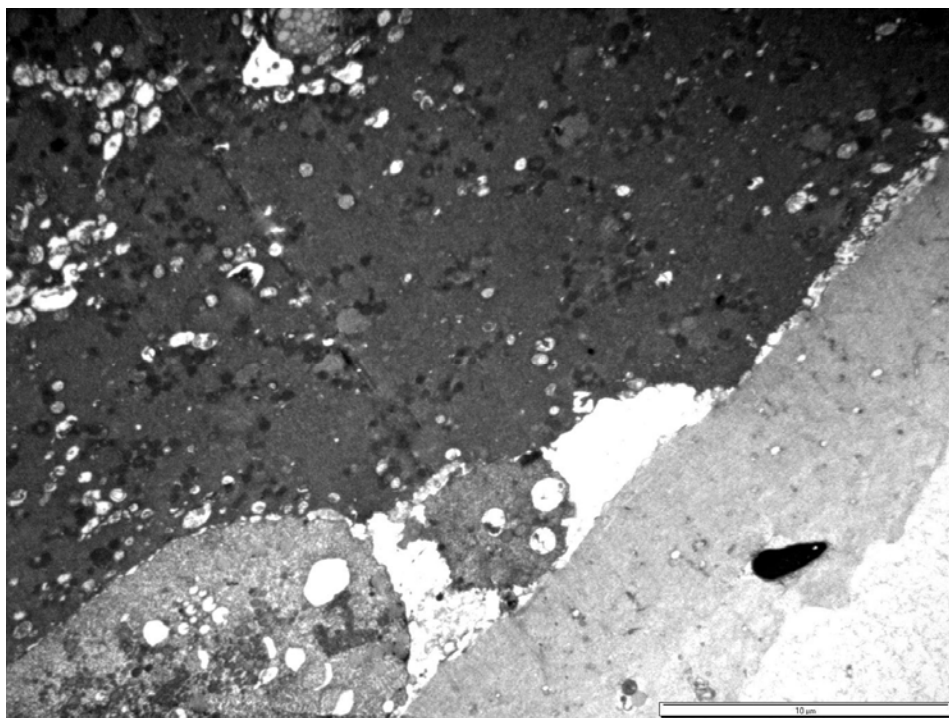


Fig. 19

Membrana acrozomială externă pare a fi fenestrată, probabil evidențiază un început de reacție acrozomială, aspectul electronoptic al capetelor spermilor nu indică procese de decondensare a cromatinei, în jurul spermilor, în zona lucidă există o ușoară rarefiere a texturii macromoleculare a zonei ceea ce pare să indice o anumită activitate a enzimelor acrozomiale (fig.20).

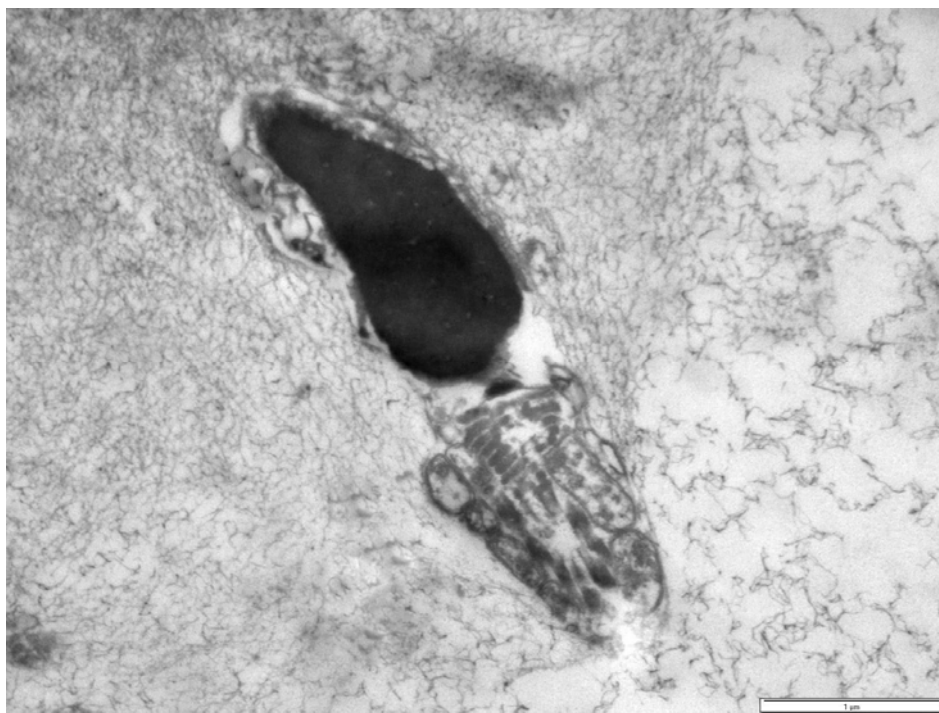


Fig. 20

Pe imaginile obținute de la stadiul de prezigot, embrioni aflați în diferite stadii de segmentare, 3,5,8 celule, deasemenea în zona pelucidă sunt prezente spermii atașate la marginea externă a zonei pelucide (fig.21, 22).

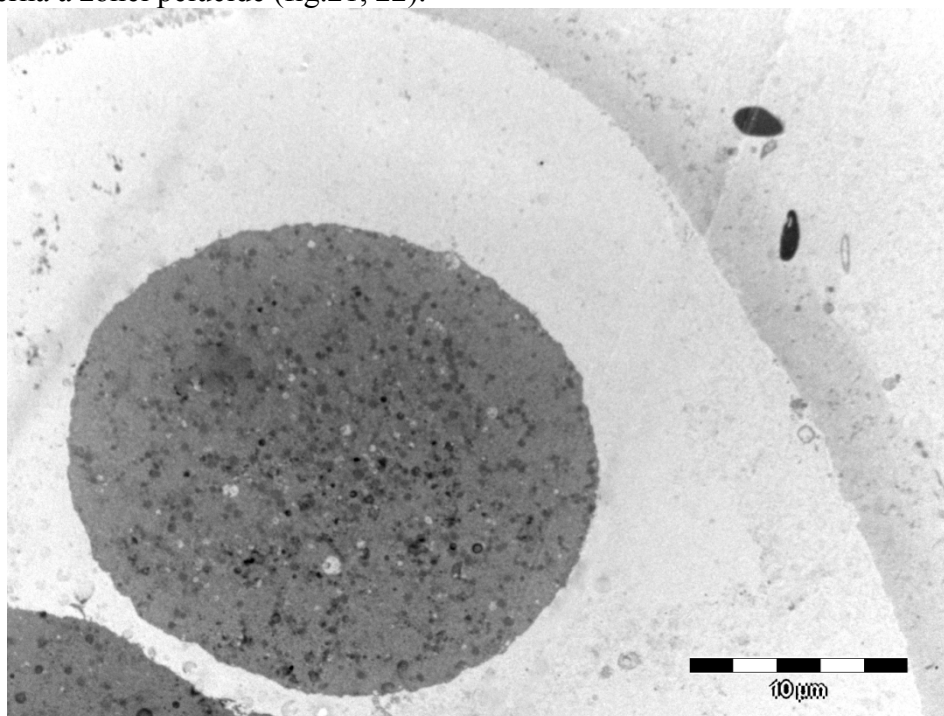


Fig. 21

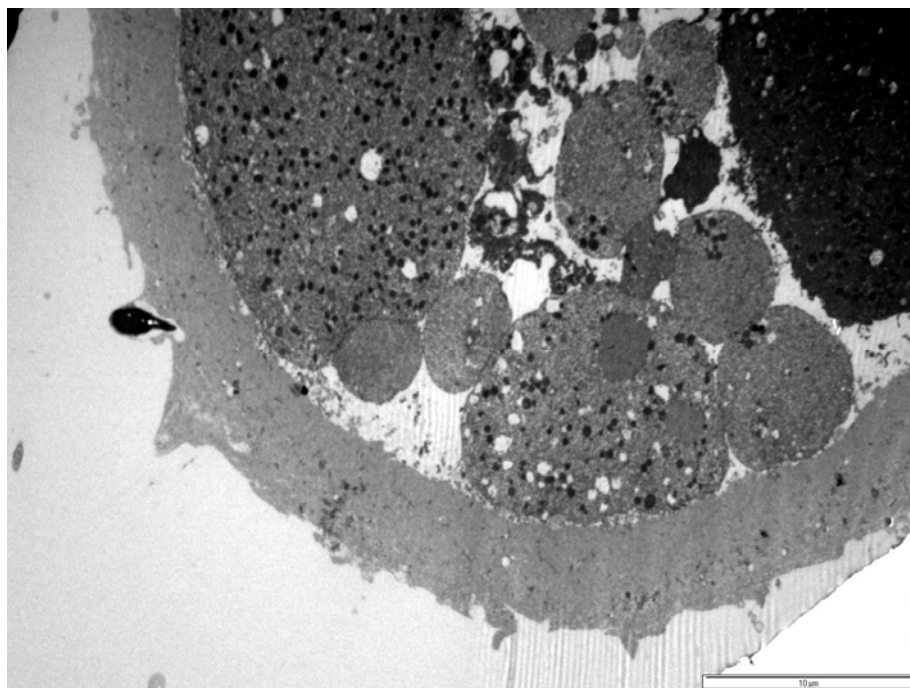


Fig. 22

Chiar și la stadiul de *blastocist* în zona pelucidă se pot observa spermii. În Fig. 23 se observă o celulă din trofoblastul blastocistului și zona pelucidă cu un cap de spermie și cozi în secțiune transversală.

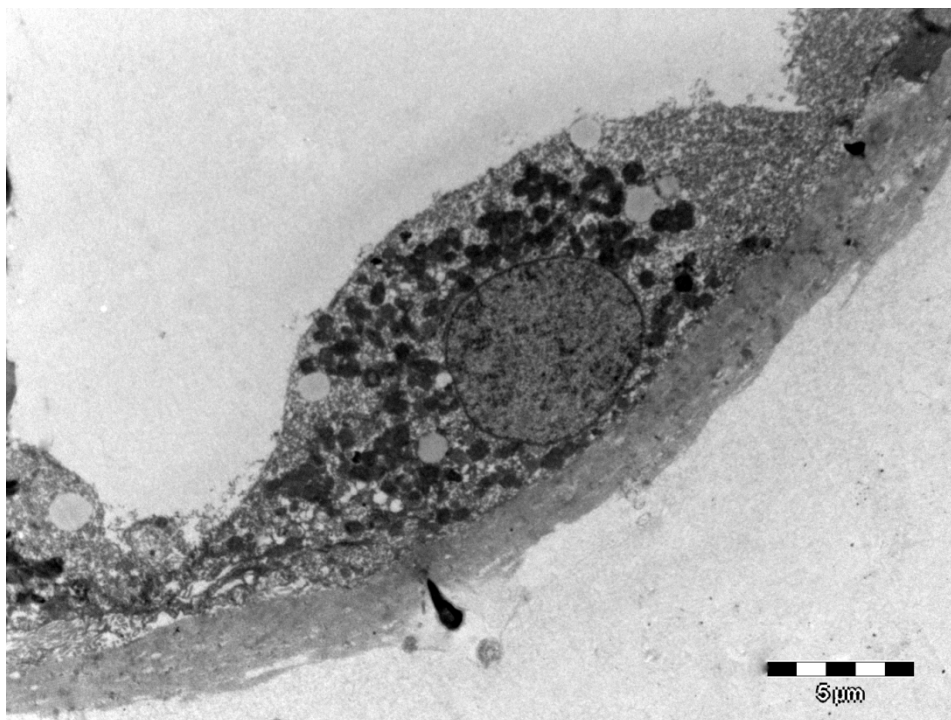


Fig. 23

Concluzii asupra spermilor.

Descrierea secvențială a ultrastructurii spermilor care au petrecut diferite perioade de timp în mediul de cultură (3,6,18 ore) în absența ovocitelor, nu a mai fost semnalată în literatură.

Studiul nostru arată că ultrastructura spermilor la o oră și la 6 ore de incubație este normală, spermii fiind apte pentru a fecunda.

După 10-12 ore de incubație apar modificări ultrastructurale care indică procese de alterare, care arată că spermii nu mai fecundază.

Modificările ultrastructurale, descrise de noi, la spermii care au stat cel puțin 18 ore în mediul de cultură sunt:

- ▶ dilatarea acrozomului,
- ▶ matricea acrozomială cu aspect electronoptic mai puțin dens,
- ▶ prezenta unor vacuole în matricea acrozomială,
- ▶ fenestrarea membranei externe acrozomiale.
- ▶ aspect electronoptic mai pal al nucleului, ceea ce ar indica un proces de degenerescentă.

Acrozomul este structura cea mai puternic modificată, indicând un început de reacție acrozomială.

Aceste modificări explică de ce spermii nu își păstrează capacitatea fecundantă nici măcar 18 ore în mediu de cultură în absența ovocitelor.

Afirmația existentă în literatura de specialitate, conform căreia spermii își păstrează capacitatea fecundantă timp de câteva zile nu este susținută de cercetările noastre.

Aspectele descrise la diferitele stadii embrionare surprind prin faptul că aspectul electronoptic al spermioilor atașate la zona pelucidă, la toate stadiile analizate, demonstrează o stabilitate remarcabilă a condensării cromatinei .

Densitatea electronoptică a capetelor spermioilor atașate la zona pelucidă este aceeași chiar și după 4-5 zile petrecute în mediul de cultură (cazul blastocistoilor), nefiind evidențiate procese de decondensare a cromatinei sau alte aspecte care să indice eventuale procese degenerative, demonstrând capacitatea de conservare a zonei pelucidă.

Imagini cu materialul nuclear decondensat (degenerare) nu am observat la niciunul din stadiile embrionare analizate (prezigot, embrioni de 4-5 celule, blastocist).

Studii privind ultrastructura ovocitelor aflate în diferite stadii de maturare.

Unul din parametrii calității ovocitelor se acceptă că este reprezentat de gradul de maturitate al ovocitelor recoltate. Atât pe baza observațiilor noastre anterioare cât și pe baza datelor din literatură, la recoltare în general se pot obține trei tipuri de ovocite: imature, mature și postmature, luând ca parametru de referință, aspectul la microscopul optic al coroanei radiate și cumulusului ovocitului. Desigur că stadiul optim pentru a obține fecundația, este cel de ovocit matur.

Investigații amănunțite la nivel ultrastructural a celor trei categorii de ovocite va permite o caracterizare ultrastructurală a fiecărui tip de ovocit, precum și evidențierea unor *eventuale* diferențe la nivel ultrastructural, între cele trei tipuri de ovocite. Caracterizarea ultra-structurală va permite și stabilirea unei corespondențe între aspectul ultrastructural al ovocitului și aspectul său în microscopia optică.

Menționăm că potrivit cu normele etice, am folosit pentru investigațiile propuse doar ovocitele și embrionii supranumerari și pentru care am avut acordul expres al cuplurilor respective.

Analiza și studiul sutelor de imagini de microscopie electronică obținute de la diferite tipuri de ovocite fixate (mature, imature, postmature, nefecundate și maturate *in vitro*), au evidențiat o serie de aspecte, unele dintre ele descrise și în literatura de specialitate, multe dintre ele fiind însă aspecte inedite, nedescrise în literatură.

Ovocitul matur.

La microscopul optic ovocitul matur este identificat după aspectul cumulusului și mai ales al coroanei radiate. Celulele din cumulus au o răspândire relativ uniformă în masa gelatinoasă a cumulusului. Coroana radiată are celule foliculare dispuse, mai mult sau mai puțin, radial în jurul ovocitului îmbrăcând un aspect tipic, identificabil la stereomicroscop și la microscopul optic (fig.24, 25)

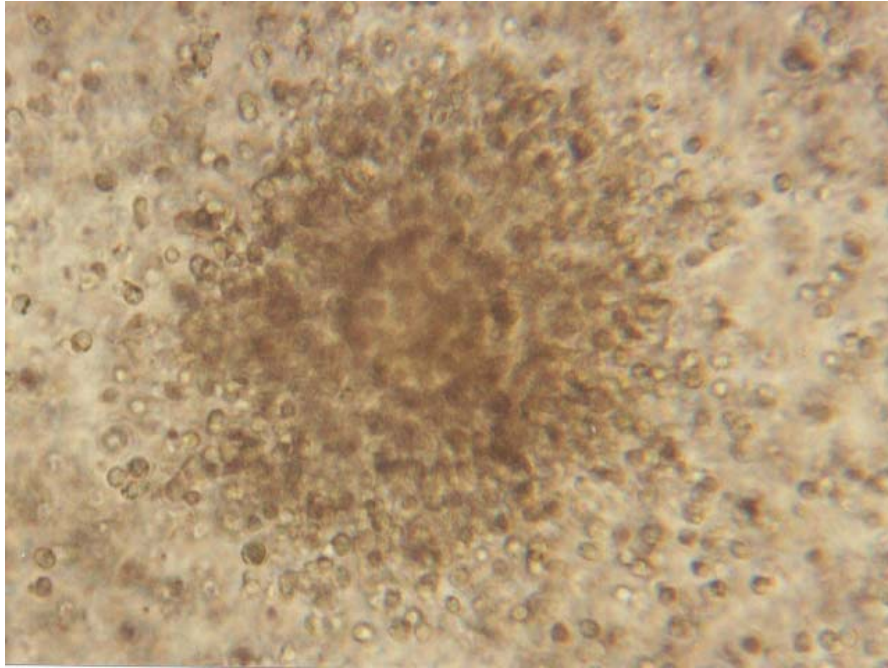


Fig. 24

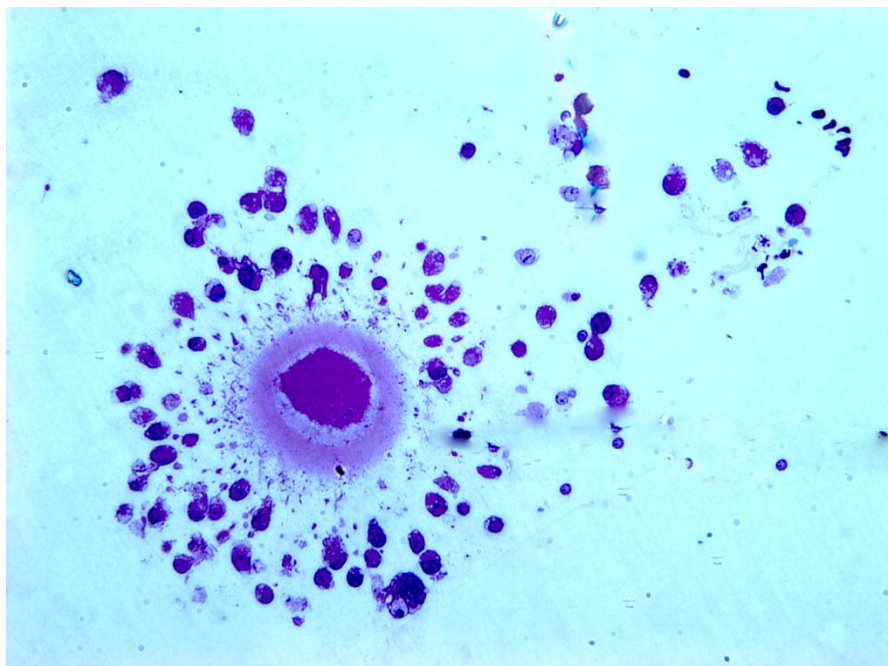


Fig. 25

Ultrastructura ovocitului matur.

Coroana radiata.

Ultrastructura acestor celule este diferită de cea a ovocitului și ele au aspect tipic de celulă eucariotă. Caracteristic pentru majoritatea dintre ele este prezența a numeroase vezicule de secreție pline cu material de natură lipidică (probabil hormoni estrogeni). În citoplasma acestor celule sunt bine exprimate organitele implicate în procese de sinteză. Sunt prezente complexul Golgi, mitocondrii numeroase de tip filamentos, reticul endoplasmic rugos, reticul endoplasmic neted sub formă veziculară, vezicule lipidice. Nucleul acestor celule este mare de formă sferică sau neregulată prezintă un nucleol cu aspect reticulat (fig.26,27)

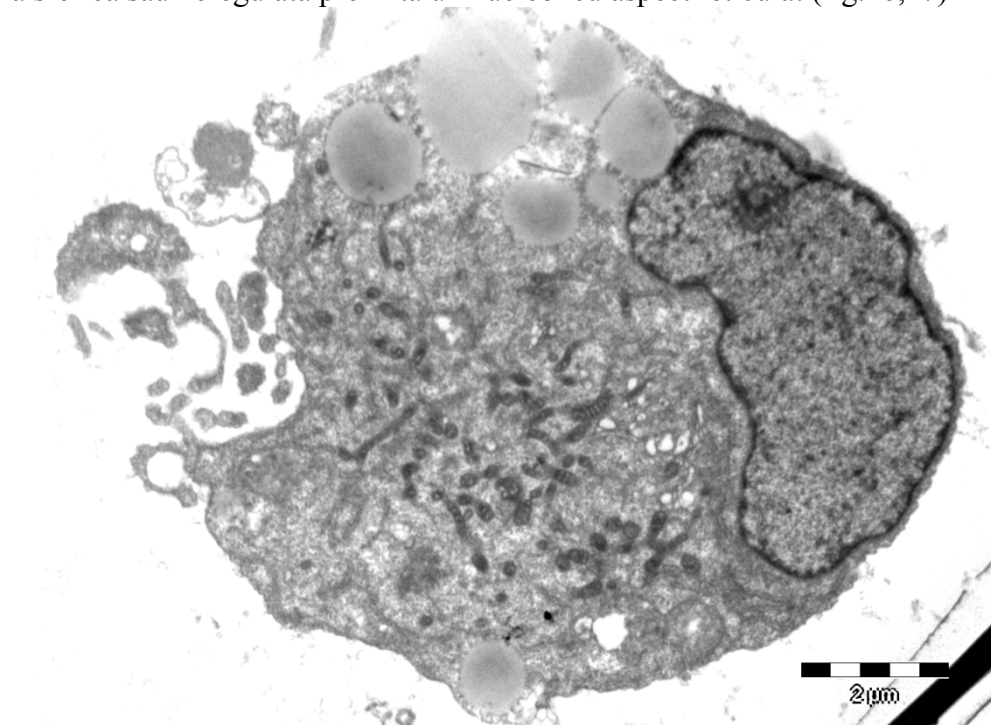


Fig. 26

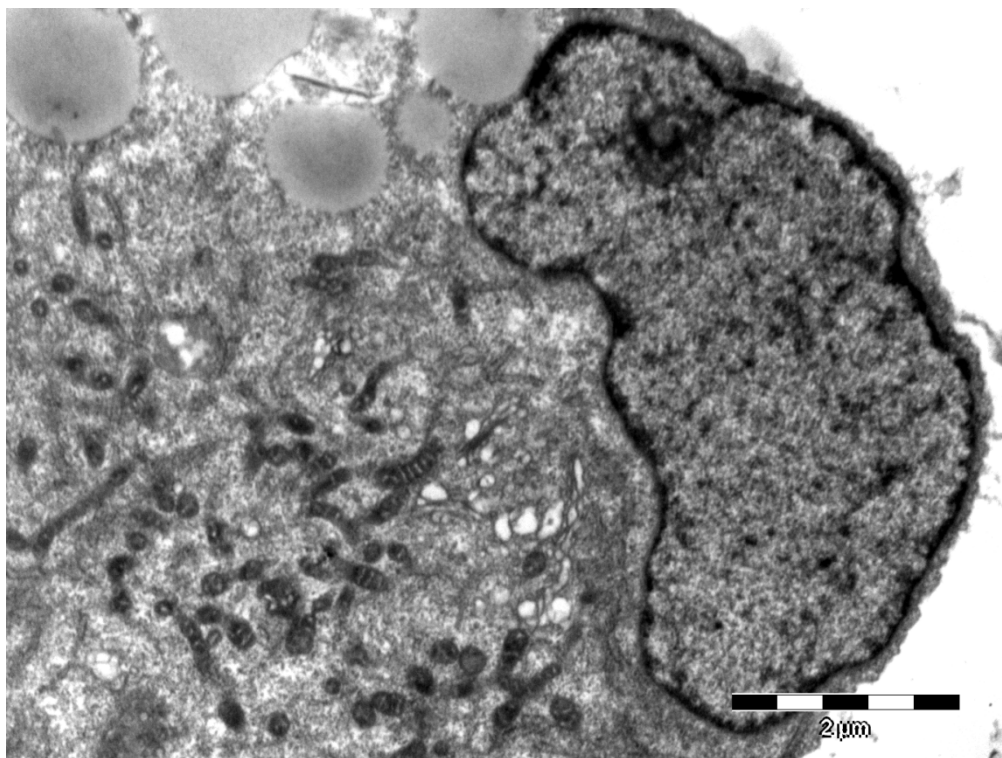


Fig. 27

Zona pelucidă. La microscopul optic apare ca o coajă (înveliș) gelatinos în jurul ovocitului. Imaginile de SEM ne evidențiază că zona pelucidă este o țesătură de macromolecule glicoproteice filamentoase, care alcătuiesc un înveliș gros de circa 10-15 micrometri în jurul ovocitului.

Zona pelucidă are o densitate electronoptică mai mare pe fața internă și mai mică pe fața externă. Marginea externă a zonei pelucide având un aspect mai rarefiat prezintă numeroase neregularități comparativ cu fața internă a zonei pelucide care are un aspect mult mai uniform (fig.28,29)

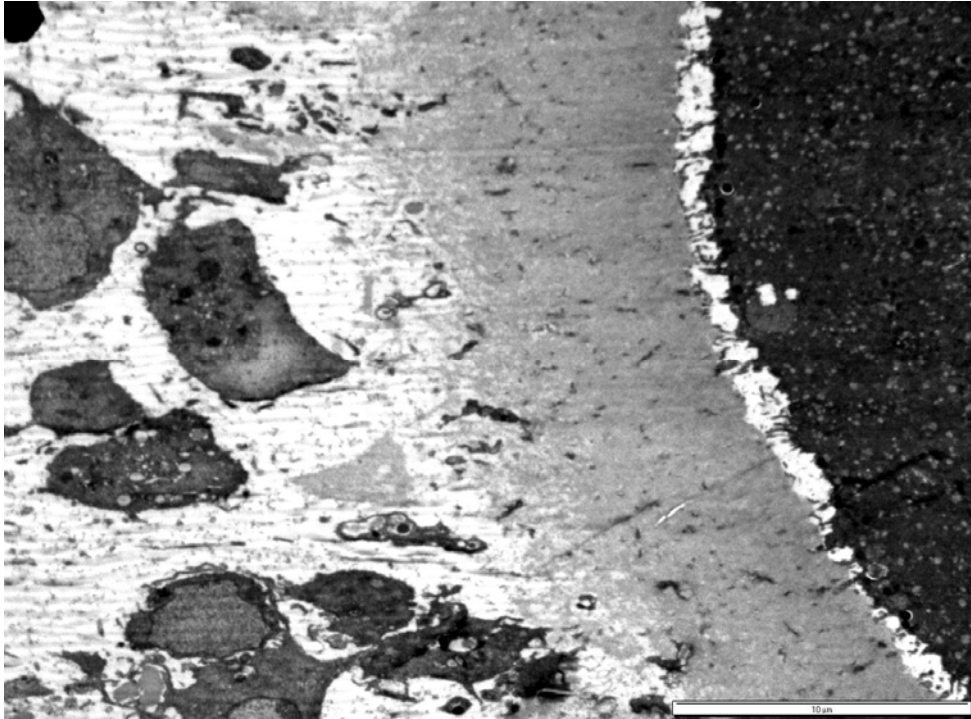


Fig. 28

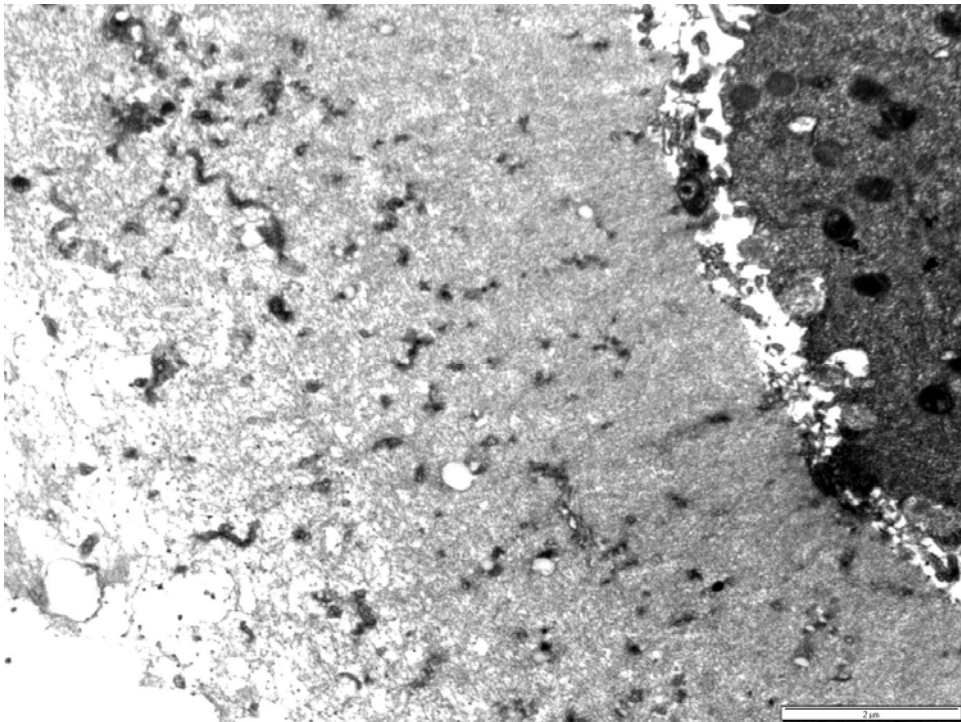


Fig. 29

Citoplasma ovocitului. În citoplasma ovocitului matur găsim organele prezente în orice celulă eucariotă, dar cu anumite particularități specifice, precum și structuri caracteristice ovocitului.

- Mitocondriile sunt numeroase, au formă sferică cu densitatea electronoptică mare (cristele cu greu se pot distinge);
- Reticulul endoplasmic este abundent, dar numai sub formă de reticul endoplasmic neted (REN); nu se prea observă prezența de reticul endoplasmic rugos (RER) sau de ribozomi. REN-ul este prezent sub forma unor vezicule cu diametre variabile ce conțin în interior un material amorf filamentos, mediu electron-dens, cu aspect electronoptic asemănător celui din zona pelucidă ;
- Complexul Golgi, nu foarte frecvent, este prezent în zona centrală a ovocitului și are aspectul tipic cu sacii golgieni ușor dilatați.
- Ovocitul matur nu prezintă nucleu, el aflându-se în metafaza a II-a a meiozei și prin urmare în citoplasma periferică, în dreptul primului glob polar este prezent fusul de diviziune cu condensările cromozomiale aferente.
- La periferia citoplasmei sunt prezente elementele caracteristice ale ovocitului matur – *granulele corticale* -, formațiuni sferice dispuse pe 1-2 rânduri, cu aspect electron-optic dens datorită conținutului lor enzimatic-proteic, cu rol important în prevenirea polispermiei (fig.30,31)

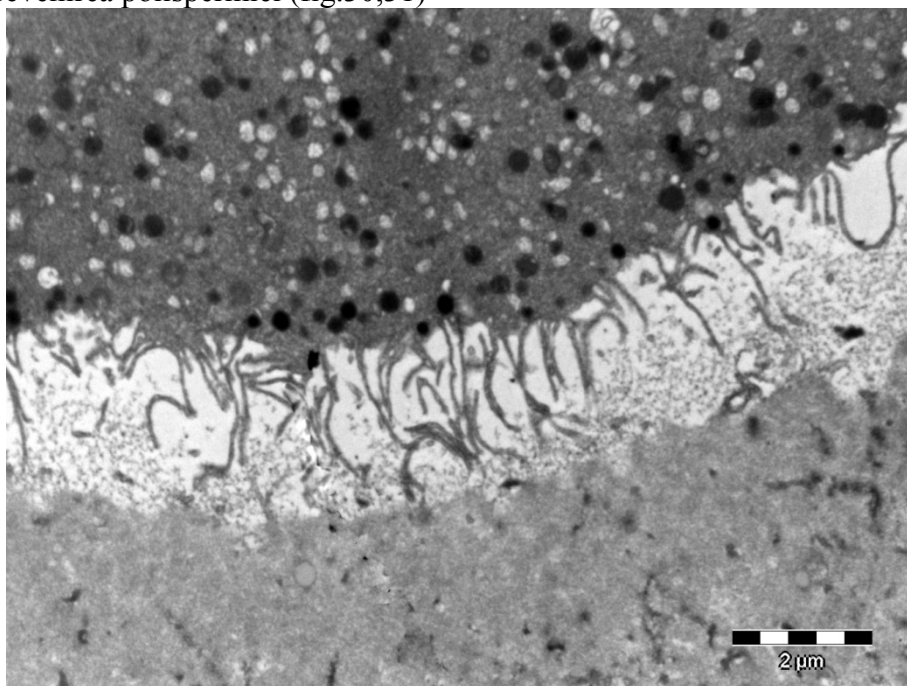


Fig.30

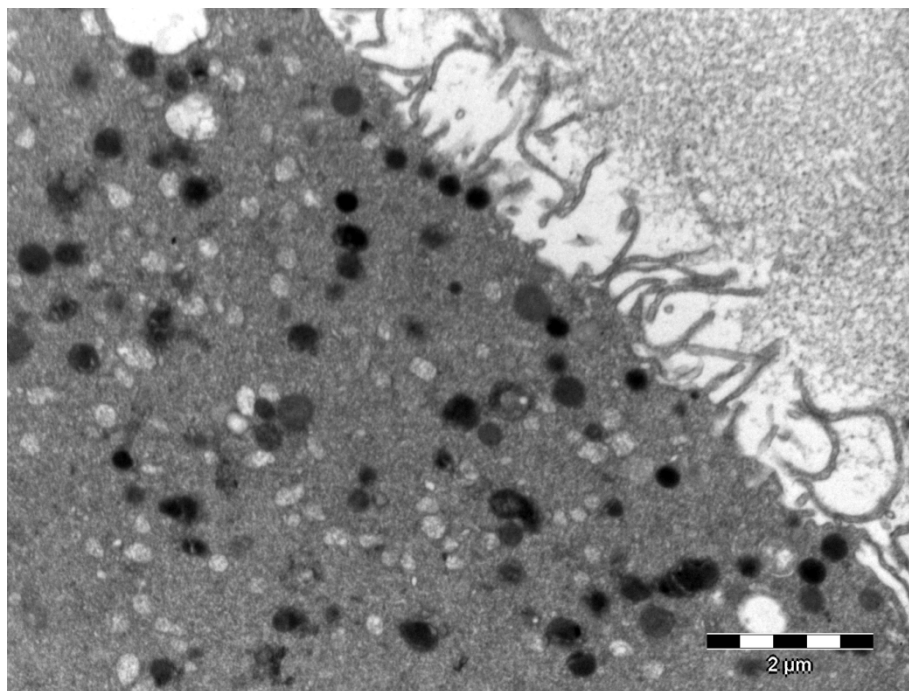


Fig. 31

Ovocitul imatur.

La microscopul optic ovocitul imatur este identificat după aspectul cumulusului și mai ales al coroanei radiata. Astfel cumulusul are o răspândire mai neuniformă a celulelor, existând ici colo mici aglomerări celulare. Coroana radiata are celule foliculare strâns agregate în jurul ovocitului. Aspectul coroanei radiata este relativ ușor de cuantificat, mai ales în comparație cu aspectul caracteristic al coroanei radiata de la ovocitul matur (fig.32)

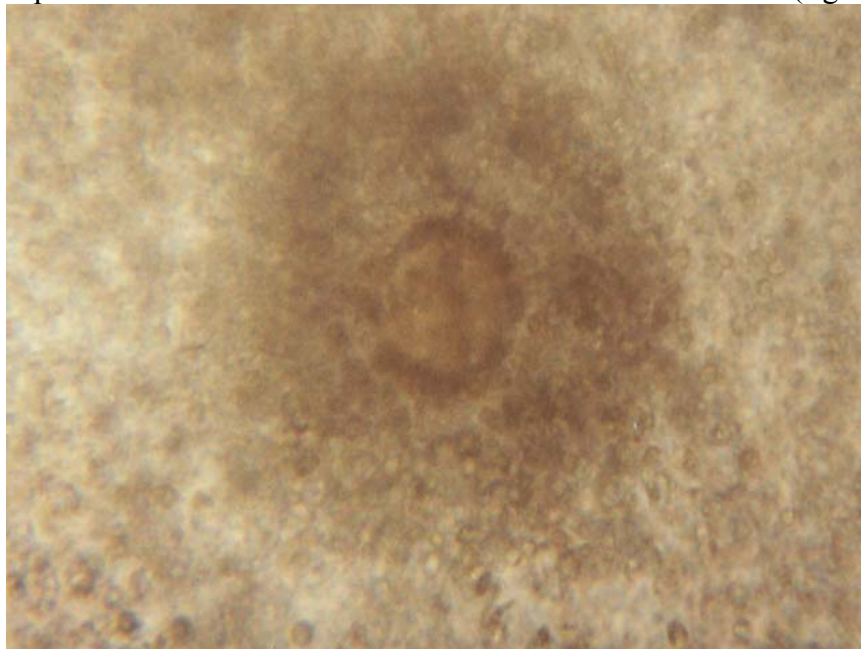


Fig.32.

Ultrastructura ovocitului imatur.

Ultrastructura *ovocitelor imature* fixate imediat după recoltare evidențiază câteva aspecte caracteristice inedite nesemnificate încă în literatura de specialitate.

Coroana radiata. Celulele coroanei radiata la ovocitul imatur sunt mai strâns împachetate comparativ cu cele de la ovocitul matur (multe celule au formă piriformă), aspect ce se observă bine și pe imagini de microscopie electronică (fig.33).

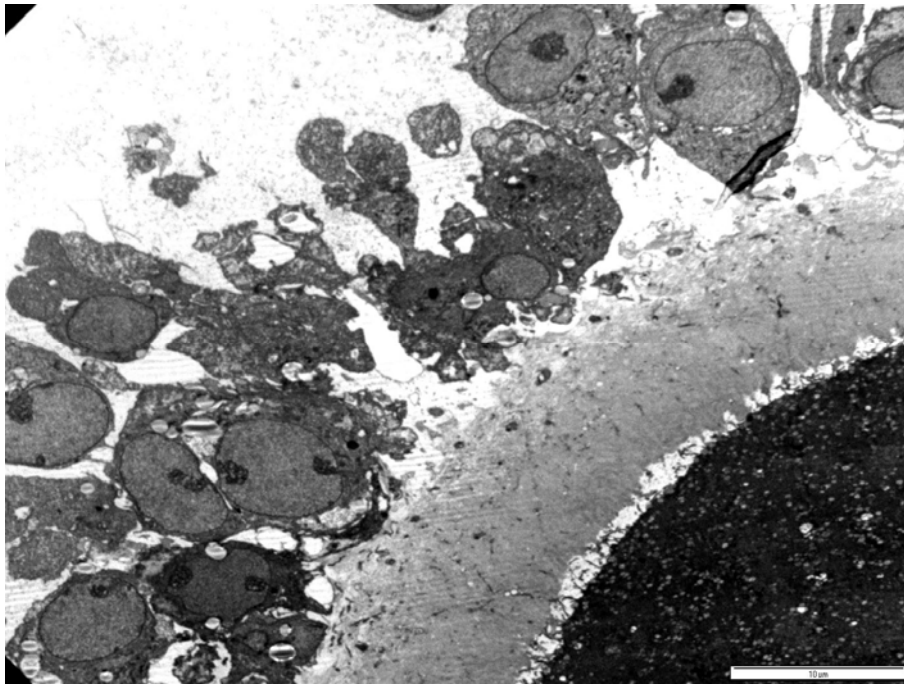


Fig. 33

Spre deosebire de celulele de la ovocitul matur aici multe celule ale coroanei radiata au nucleul cu 2 nucleoli de tip reticulat, evidențiind un intens proces de sinteză proteică (fig.34, 35)

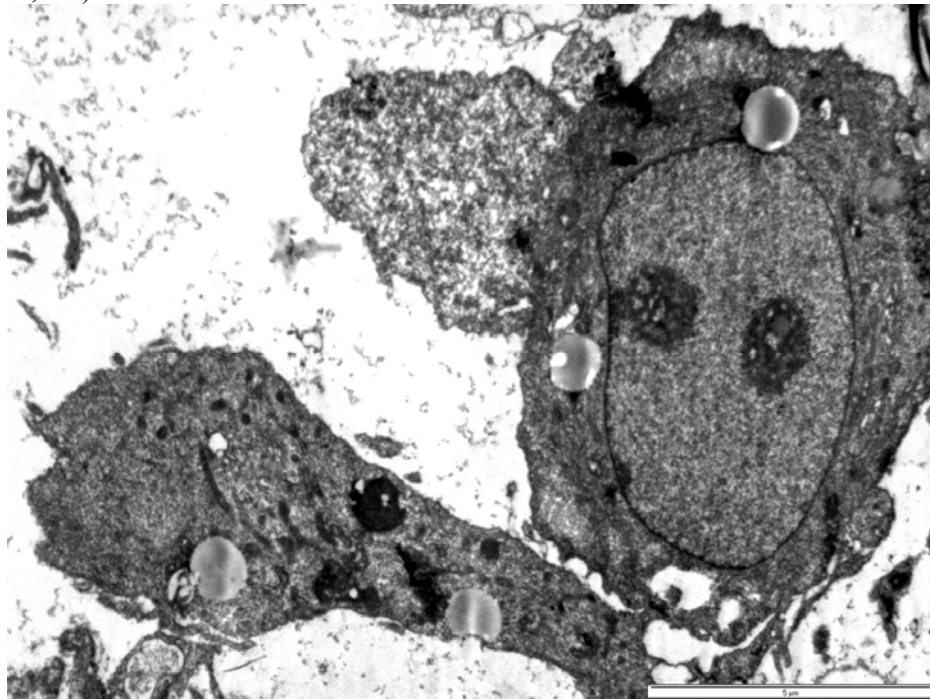


Fig. 34.

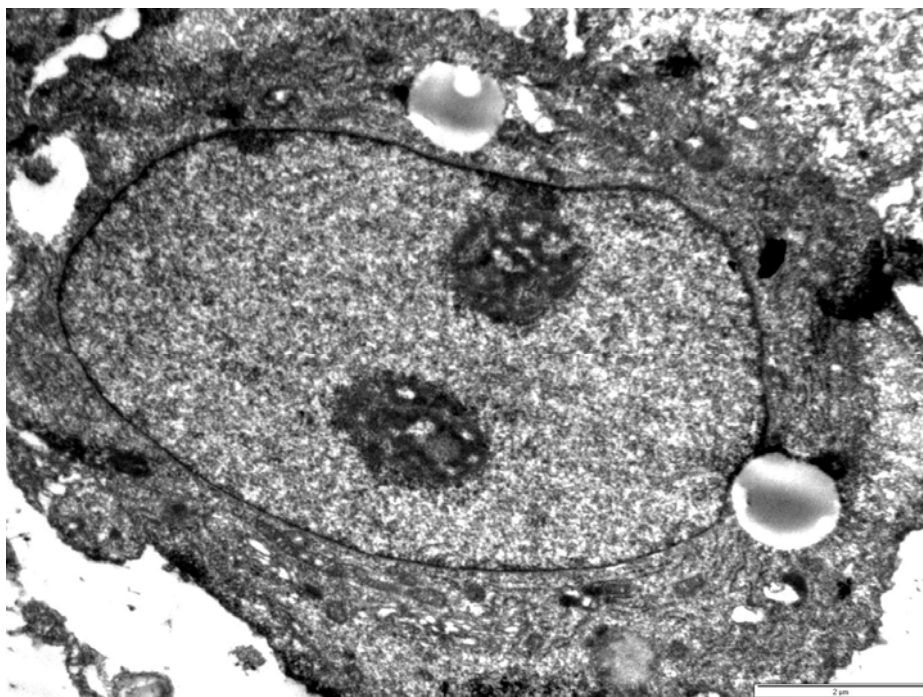


Fig. 35.

Zona pelucidă

Zona pelucidă are în general aspectul descris la ovocitul matur, cu partea externă mai rarefiată și partea internă mai densă, cu granulații și fibrile electronoptice dense.

Caracteristic pentru zona pelucidă de la *ovocitele imature* este faptul că aceasta nu este încă pe deplin edificată. Această concluzie se desprinde din constatarea că fața internă, mai ales în regiunea în care spațiul perivitelin este foarte mic, este puternic neregulată. Dinspre ovocit pornesc spre zona pelucidă „punți” formate dintr-un material cu același aspect electronoptic ca și materialul din care este alcătuită zona pelucidă (fig.36, 37).

Spațiul perivitelin se caracterizează printr-o mai mare abundență de microvili emiși de ovocit (fig.36)

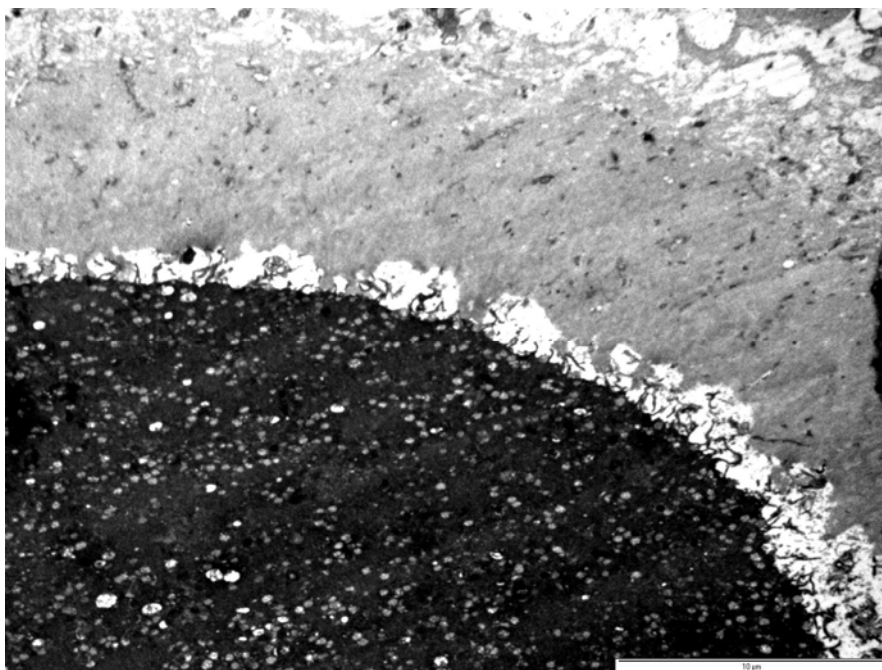


Fig. 36.

Citoplasma.

Citoplasma ovocitului imatur prezintă elementele structurale descrise la citoplasma ovocitului matur cu anumite deosebiri.

- Veziculele de REN sunt mult mai abundente,
- Sunt prezente numeroase vezicule de secreție ce conțin un material filamentos de aceeași consistență și nuanță electronoptică cu materialul ce intră în structura zonei pelucide. La mărimi mari se observă foarte bine astfel de vezicule surprinse în plin proces de eliminare a conținutului lor prin exocitoză în spațiul perivitelin.

Prin acest proces este eliberat în spațiul perivitelin materialul sintetizat în citoplasma ovocitului, (glicoproteine și proteoglicani), material, ce va deveni parte componentă a țesăturii macromoleculare a feței interne a zonei pelucide, aspecte evidențiate în premieră.

În citoplasma periferică a ovocitului imatur am observat un număr extrem de redus de granule corticale, comparativ cu ovocitul matur, acesta fiind încă un aspect specific ovocitului imatur (fig. 37).

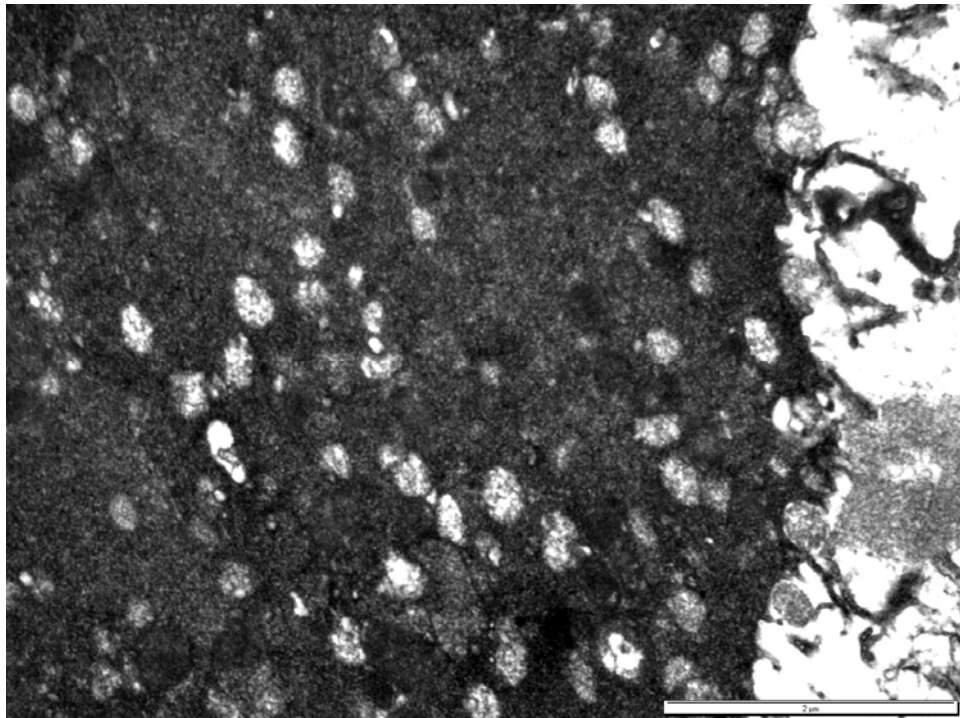


Fig. 37.

Ovocitul postmatur.

Ovocitul postmatur recoltat poate fi recunoscut la stereomicroscop și microscopul optic, după aspectul cumulusului și al coroanei radiata.

Cumulusul, cantitativ este mai puțin, probabil datorită consistenței mai mici a gelului și probabil că pentru același motiv celulele foliculare din cumulus sunt puternic aglomerate. Coroana radiata are celule numeric mai puține, strâns adunate în jurul ovocitului (fig.38)

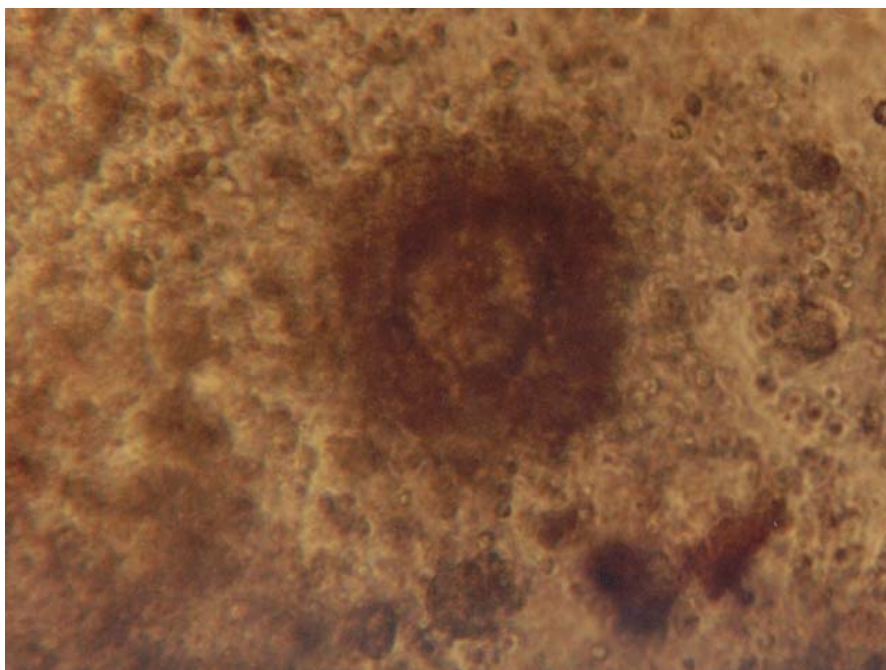


Fig. 38

Ultrastructura ovocitului postmatur.

Celulele coroanei radiata sunt mai strâns așezate și atașate la zona pelucida comparativ cu ovocitul matur, în general cu aspectul tipic de celule producătoare de compuși steroidici (cu vezicule lipidice caracteristice), dar sunt prezente și celule cu semne de îmbătrânire (degenerescență) – corpi reziduali, dilatări vacuolare, (fig. 39), iar printre celule se văd multe fragmente celulare. (fig. 40).

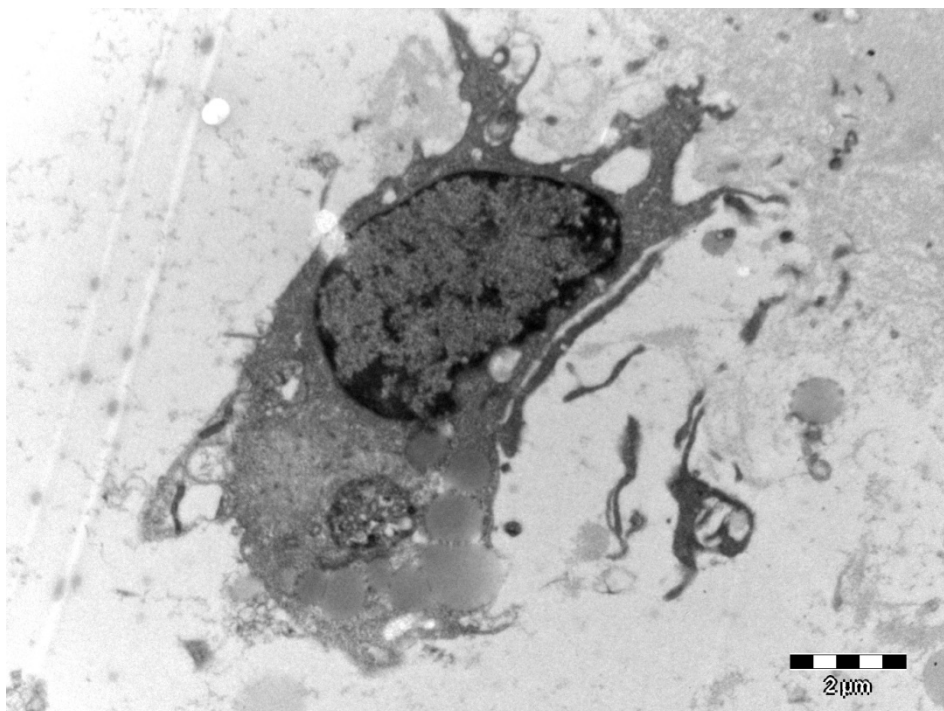


Fig. 39

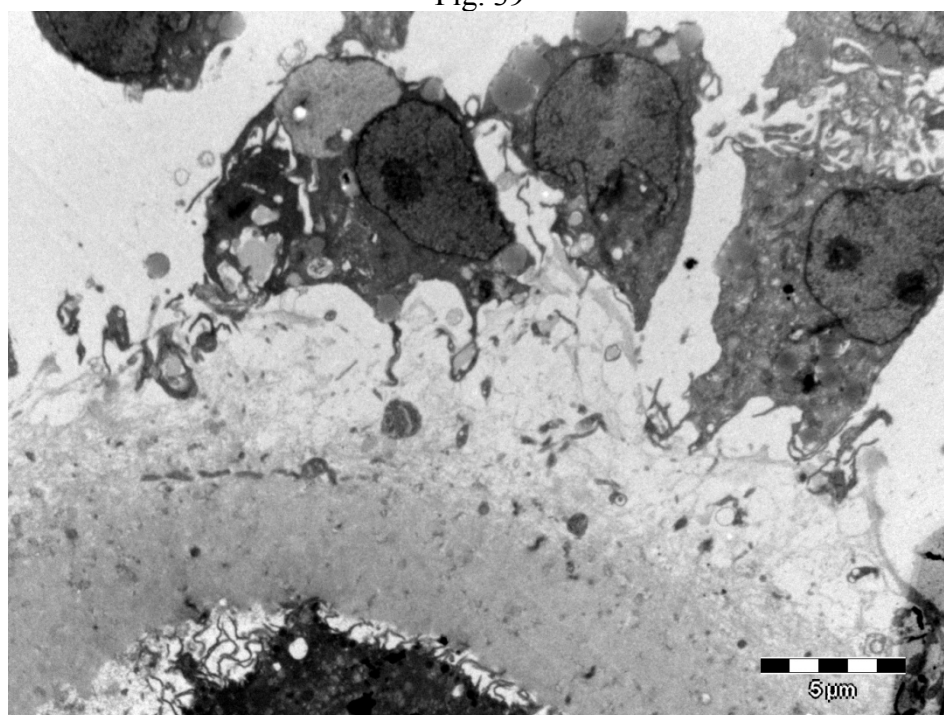


Fig. 40

Citoplasma.

La nivelul citoplasmei ovocitului postmatur putem decela semne clare de degenerescență a acesteia.

- În zona centrală a citoplasmei sunt prezente *aglomerări vacuolare- vacuole autofagice*, care probabil provin prin vacuolizarea și dilatarea veziculelor de REN, iar în citoplasma periferică apar *aglomerări mitocondriale*. (fig.41)

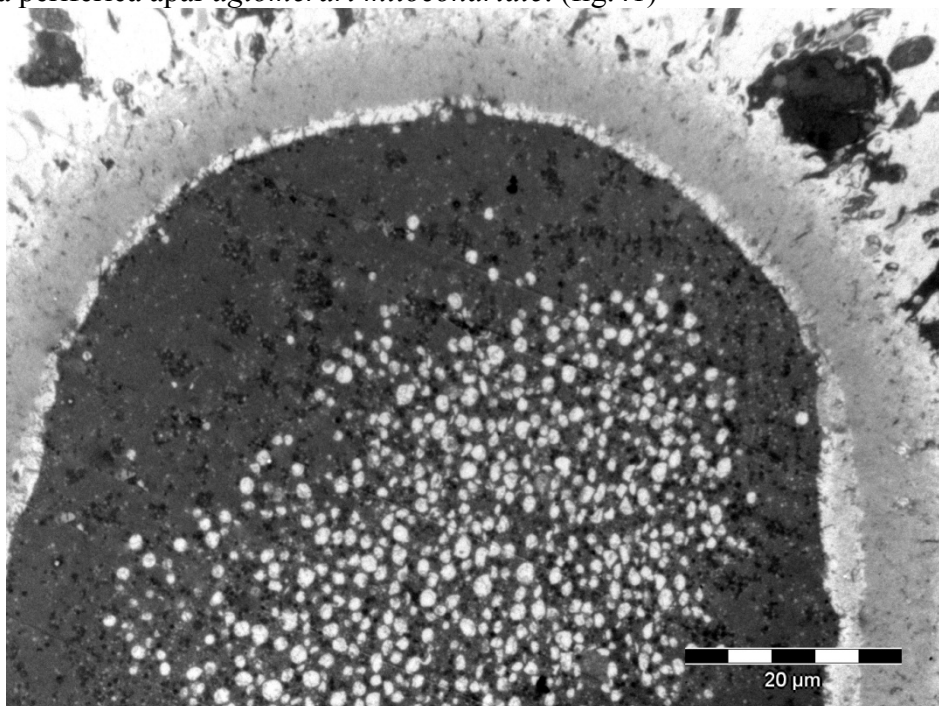


Fig. 41.

- La periferia citoplasmei se pot identifica granule corticale, fie dispuse în unistrat, fie sub formă de aglomerări de granule corticale.(fig.42)

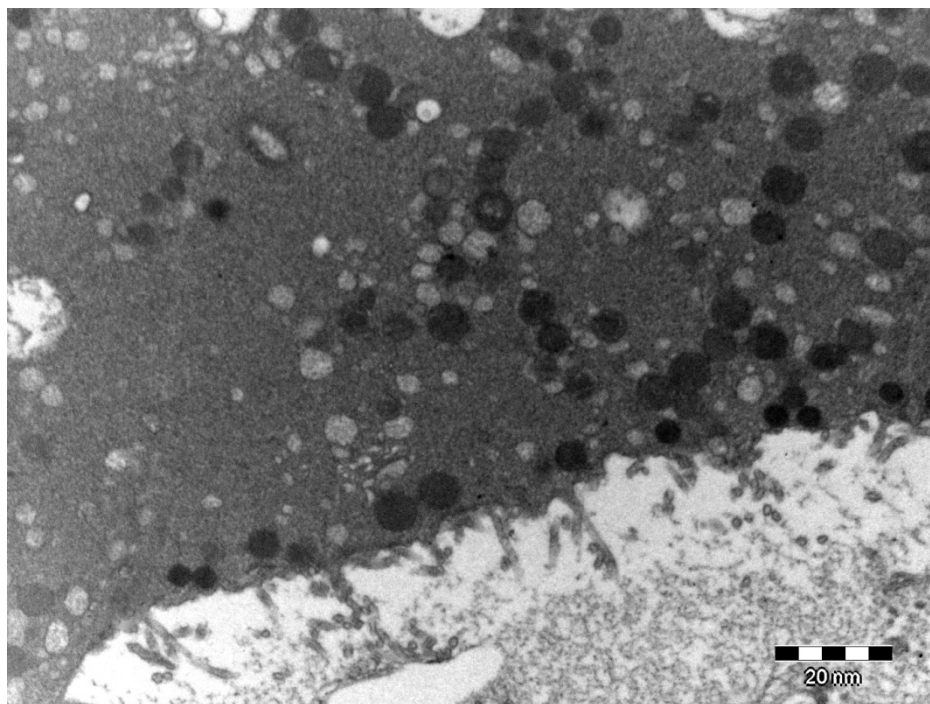


Fig. 42.

- ▶ La unele ovocite citoplasma este ratatinată, ovocitul având o formă neregulată.
- ▶ Se pot identifica zone cu densitate electronoptic mai mică.

Ovocite mature nefecundate.

Studiul secțiunilor obținute de la ovocite care la 24 ore de la recoltarea și inseminarea ovocitelor, la controlul fecundației, au fost diagnosticate ca fiind nefecundate, au evidențiat câteva aspecte interesante.

a). O parte dintre ovocitele nefecundate examinate au prezentat aspecte ultrastructurale asemănătoare cu aspectele evidențiate la ovocitele postmature. Pe secțiuni semifine se văd foarte bine: zona pelucidă cu capete de spermii atașate, spațiul perivitelin cu microvili iar în citoplasma ovocitului se întrevăd zone de citoplasmă mai slab colorate. În citoplasmă se observă: mitocondrii, vezicule REN, zone slab electronodense înconjurate de mitocondrii, corpi multiveziculari. Aceste date ne fac să credem că în momentul recoltării aceste ovocite aveau deja alterări ultrastructurale, care de fapt au condus la nerealizarea fecundației. (fig. 43)

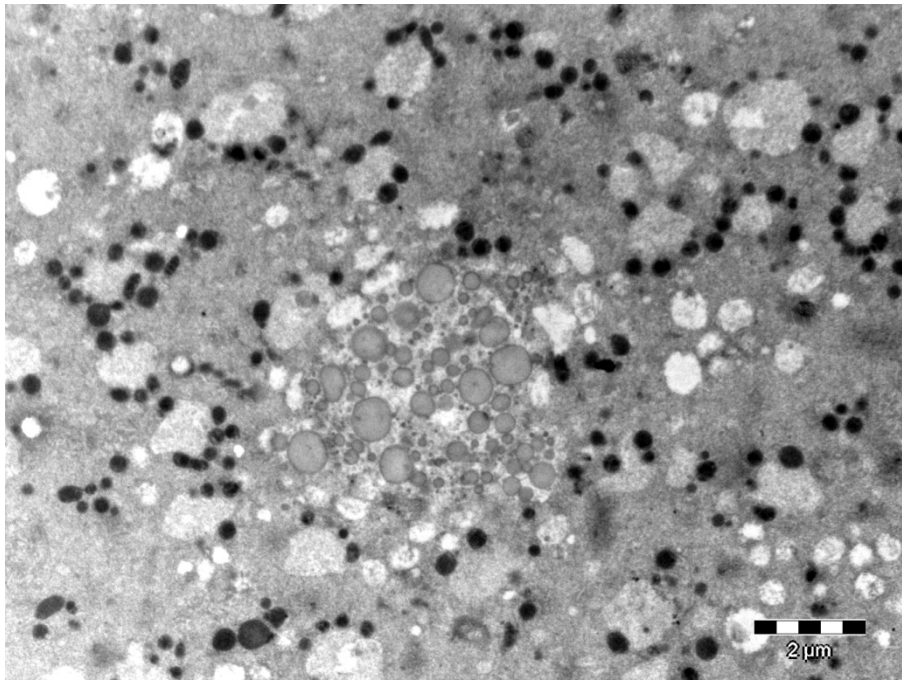


Fig. 43.

O altă parte din ovocitele nefecundate mature examinate, au prezentat aspecte ultrastructurale caracteristice ovocitului matur, în citoplasmă fiind prezente multe mitocondrii, vezicule de REN, microvili în spațiul perivitelin, zona pelucidă cu aspect caracteristic. În marginea externă a zonei pelucide sunt prezente capete de spermii. (fig.44)

O deosebire ultrastructurală importantă față de ovocitul matur, este că la aceste ovocite numărul *granulelor corticale* din citoplasma periferică este mult mai mic. (fig.45).

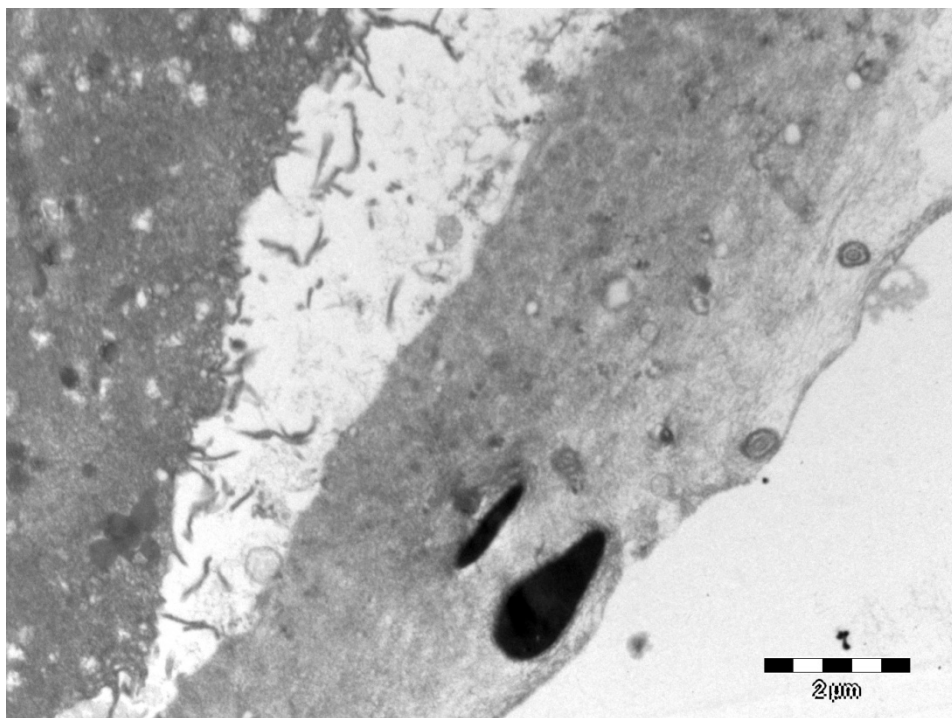


Fig. 44

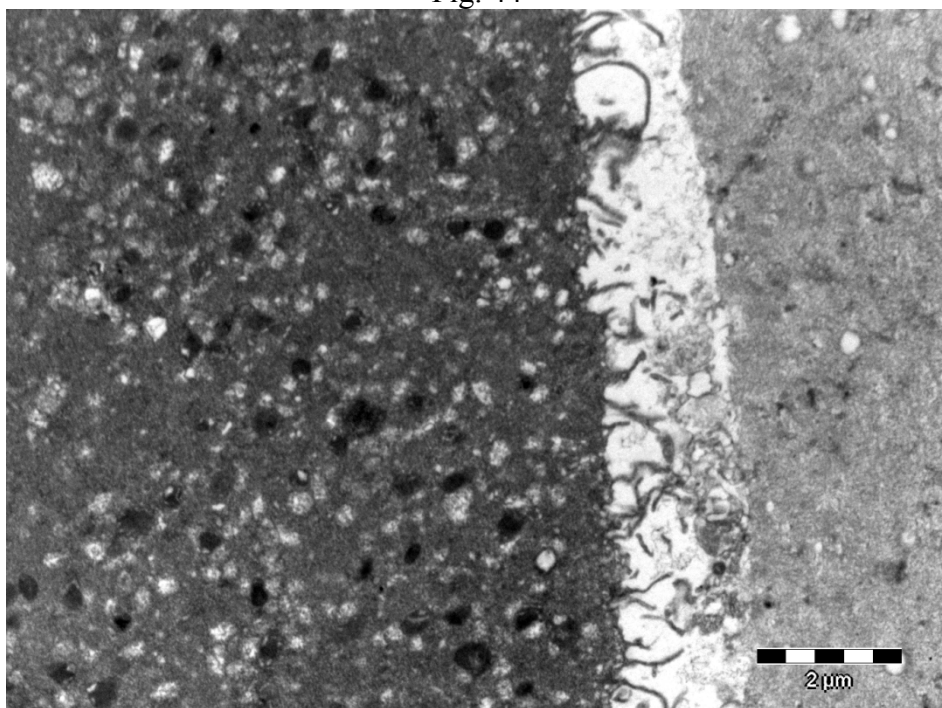


Fig. 45.

Maturarea *in vitro* a ovocitelor imature.

Pentru a mări șansele de succes, în procedeele FIV, se are în vedere obținerea unui număr crescut de embrioni calitativ buni, ceea ce constituie un deziderat strict necesar.

După cum am afirmat și anterior, ovocitele recoltate după o stimulare hormonală nu sunt toate în același stadiu de maturare, astfel că la o puncție ovariană se obțin alături de ovocite mature aflate în metafaza a II-a meiozei, și un procent de 15-20% ovocite imature care nu se vor fecunda.

Pentru a înlătura acest neajuns, în ultimii ani s-au încercat diferite variante de tehnici care să ducă la maturarea *in vitro* a ovocitelor imature.

O astfel de procedură devine strict necesară în cazul în care în urma stimulării ovariene se dezvoltă un număr mic de foliculi și se recoltează un număr mic de ovocite unele dintre ele fiind imature.

După recoltare ovocitelor, a fost apreciat (la microscopul optic) gradul lor de maturitate, ovocitele socotite imature au fost separate de restul ovocitelor și au fost trecute în mediu de cultură proaspăt (Ham F-10, sau IVF-Medicult).

Pentru a induce maturarea, ovocitele imature au fost păstrate în incubator la 37°C, 5% CO₂, timp de 24 de ore în mediile amintite.

După 24 ore s-a controlat aspectul cumulusului și al coroanei radiata, s-a apreciat gradul de maturare și în proporție de 90% ovocitele imature s-au maturat. La astfel de ovocite s-a făcut inseminarea cu spermii capacitate, proaspăt recoltate.

A doua zi, la 18-20 de ore de la inseminare, s-a făcut controlul fecundației. În proporție de 95-100% aceste ovocite, maturate 24 ore în incubator, s-au fecundat și ulterior au dat naștere la embrioni cu un ritm bun de dezvoltare, cu aspect normal fără fragmentări.

Aceste rezultate ne-au determinat să analizăm ultrastructura ovocitelor maturate *in vitro*, comparativ cu cea a ovocitelor maturate *in vivo*.

Așa cum era de așteptat, ovocitul imatur, maturat *in vitro*, în absența spermiilor, prezintă aspecte ultrastructurale foarte apropiate de cele ale ovocitului maturat *in vivo* și diferite față de cele descrise la ovocitul imatur. Deci maturarea în vitro a ovocitelor imature este posibilă și are aspect de normalitate.

În citoplasma ovocitului nu mai sunt prezente, decât în număr foarte mic, veziculele de secreție prezente în citoplasma ovocitului imatur; pe fața internă a zonei pelucide nu mai sunt prezente „punți” de material cu aspect asemănător celui din zona pelucidă, între plasmalema ovocitului și zona pelucidă, observate la ovocitul imatur. Mai sunt prezente ici și colo vezicule de exocitoză. În citoplasma periferică sunt prezente granulele corticale (mai puțin numeroase comparativ cu ovocitul maturat *in vivo*); în toată citoplasma sunt prezente mitocondrii iar în spațiul perivitelin ovocitul emite o mulțime de microvili. (fig.46).

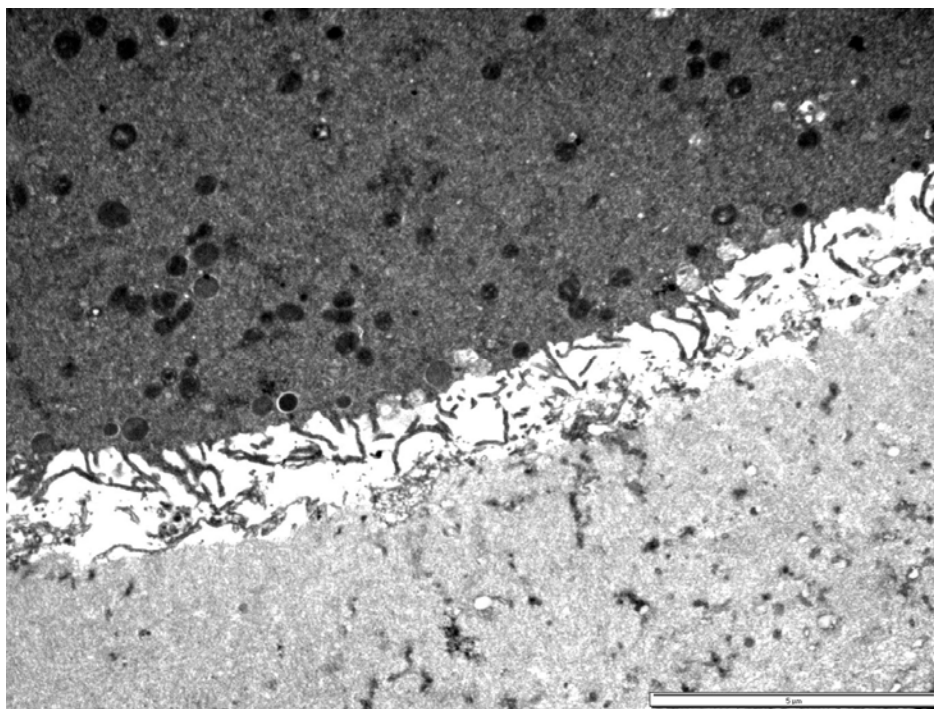


Fig. 46.

Ultrastructura ovocitului **imatur, maturat *in vitro*, în prezența spermilor** și nefecundat, este asemănătoare în anumite aspecte cu cea a ovocitului maturat *in vivo*, dar prezintă și unele deosebiri.

Astfel, ca și la ovocitul maturat *in vivo*, fața internă a zonei pelucide are aspect regulat, în plasmalema ovocitului nu sunt prezente, decât într-un număr foarte mic, procese de exocitoză de material necesar pentru edificarea zonei pelucide. În citoplasma ovocitului sunt prezente multe vezicule de REN, cu conținut, amorf puțin electrondens, precum și multe mitocondrii.

Pe de altă parte nu am identificat în citoplasma periferică a ovocitului granule corticale. (fig.47)

Nu avem o explicație pentru modalitatea prin care prezența spermilor blochează constituirea granulelor corticale în citoplasma ovocitului și maturarea completă a acestuia.

De asemenea nu avem o explicație pentru nefecundabilitatea acestor ovocite.

Pornind de la constatarea că la nici una dintre ovocitele acestea un am observat spermii atașate la zona pelucidă putem presupune că moleculele glicoproteice receptor din zona pelucidă (așa numitele ZP-uri), care recunosc moleculele semnal de pe capul spermilor și prin intermediul cărora spermii se leagă la zona pelucidă, nu se mai formează sau nu se “maturează”. Probabil că prezența hialuronidazei (eliberată de spermii) în mediu să împiedice formarea sau “maturarea” ZP-urilor din zona pelucidă.

Elucidarea cauzelor pentru care ovocitele imature, maturate *in vitro* în prezența spermilor, nu se fecundază, necesită noi investigații, mai ales că numărul ovocitelor din această categorie, pe care le-am avut pentru studiu, a fost destul de mic.

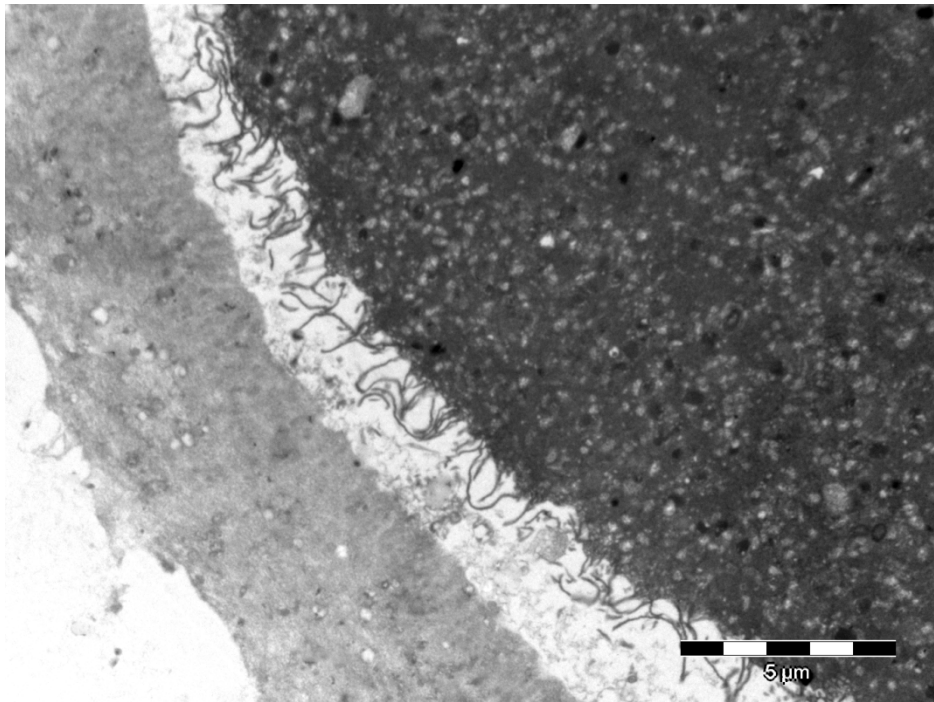


Fig. 47.

În cazul **ovocitelor fecundate** pe care noi le mai numim și **prezigoti**, sunt vizibili în citoplasma ovocitului cei 2 pronuclei. În interiorul pronucleilor se vad bine conturați câte un nucleol cu aspect uniform și dens.

În citoplasma din jurul celor doi pronuclei se observă o aglomerare puternică de mitocondrii și vezicule de reticul endoplasmic neted. Spre deosebire de ovocitele nefecundate, mature sau imature, citoplasma periferică a prezigotului are un aspect uniform și conține foarte puține mitocondrii sau vezicule de secreție. (fig.48).

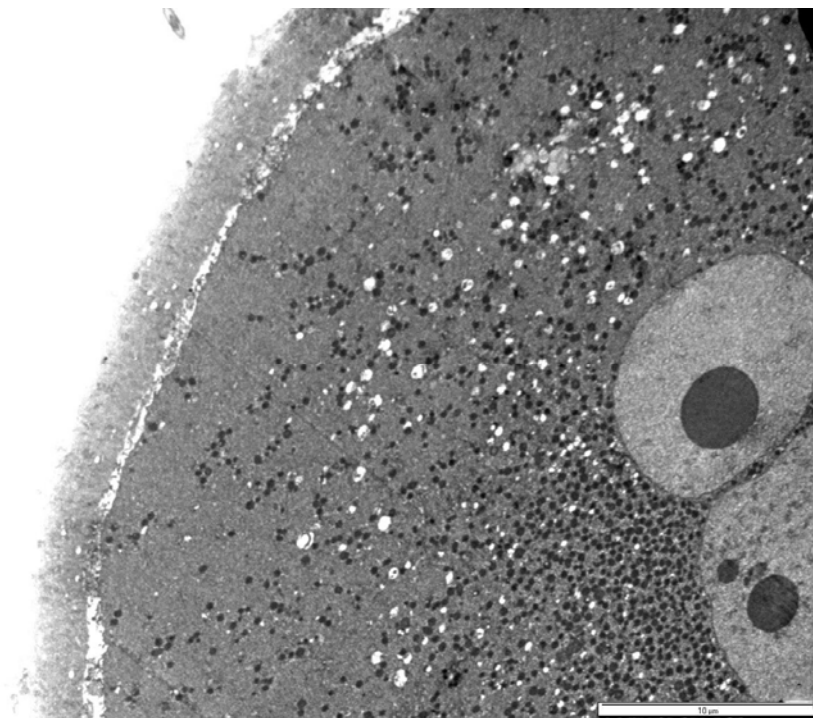


Fig. 48.

Concluzii asupra ovocitelor:

- ▶ Ovocitul este o celula cu caracter de unicat in lumea animala, cel puțin din punct de vedere ultrastructural. In general ovocitul are aceleasi organite celulare ca si orice alta celula eucariota, dar aspectul, numarul si dispunerea lor este caracteristică și nu le regasim la alte tipuri de celule ceea ce face ca imaginea de ansamblu a ovocitului să aibă aspect de unicat.
- ▶ Studiul ultrastructurii diferitelor tipuri de ovocite, recoltate în procedurile de reproducere umană asistată au permis evidențierea unor aspecte ultrastructurale caracteristice pentru fiecare tip de ovocit (prematur, matur, postmatur), unele dintre aceste aspecte fiind inedite în literatura de specialitate.
- ▶ **Stadiul de ovocit prematur** până acum nu a fost analizat în detaliu iar particularitățile structurale evidențiate de noi nu au mai fost descrise în literatura de specialitate, având următoarele caracteristici:
 - ▶ imaturitatea structurală a feței interne a zonei pelucide ilustrată de intensele procese de exocitoză detectate la nivelul plasmalemei ovocitului;
 - ▶ numărul foarte mare de vezicule de REN în citoplasma ovocitului;
 - ▶ numărul mic de granule corticale în citoplasma periferică a ovocitului.
- ▶ **Stadiul de ovocit postmatur**, prezintă ca și element caracteristic aspecte de degenerare, care probabil că explică de ce embrionii obținuți sunt fragmentați.

- ▶ **Ovocitele premature maturate *in vitro*** în absența spermilor se fecundază, dând naștere la embrioni de calitate bună, în timp ce ovocitele premature maturate *in vitro* în prezența spermilor nu ajung la maturitate și nu sunt fecundabile.
- ▶ Investigațiile ultrastructurale ale celor 3 stadii ne arată cu certitudine că între cele 3 tipuri de ovocite există de fapt forme de trecere nedetectabile prin microscopie optică și ca atare clasificarea ovocitelor după aspectul coroanei radiata și a cumulusului, la microscopul optic are o mare doză de subiectivitate.
- ▶ Pe de altă parte evidențierea heterogenității ultrastructurale a ovocitelor, explică de ce există un procent destul de mare de ovocite nefecundate, sau faptul că embrionii cu dezvoltare suboptimală au șanse mici să conducă la instalarea unei sarcini.
- ▶ În acest context se pune în discuție necesitatea folosirii unor procedee de stimulare ovariană care să conducă la situația ca în momentul recoltării toate ovocitele să fie în stadiul optim de ovocit matur, luând în considerare faptul că există și cazuri când, în urma stimulării se obțin preponderent ovocite premature (ovare polichistice).
- ▶ În ceea ce privește procedeele de stimulare ovariană, echipele FIV, adoptă 2 linii de conduită terapeutică. Majoritatea echipelor, pentru a realiza un procent mai ridicat de sarcini, se străduiesc să realizeze o stimulare ovariană care să conducă la recoltarea unui număr mare de ovocite (5-10 ovocite), pentru a se obține un număr mare de embrioni transferabili. Din investigațiile noastre reiese însă faptul că în astfel de situații se obțin și un număr mai ridicat de ovocite aflate în stadii mai puțin optime pentru fecundație, cu o ultrastructură neadecvată, deci noi nu susținem o astfel de conduită.
- ▶ Pe baza constatărilor noastre privind caracteristicile ultrastructurale ale diferitelor tipuri de ovocite, considerăm că este absolut necesară o conduită de stimulare ovariană **moderată**, care să conducă la maturarea a 3-5 ovocite și astfel există o șansă mult mai mare de a recolta ovocite mature aflate în stadiul optim de dezvoltare.

Concluzii finale:

- ▶ Spermii prelucrate (capacitate) care petrec 18 ore în mediul de cultură își pierd capacitatea fecundantă datorită modificărilor ultrastructurale de la nivelul acrozomului.
- ▶ Din punct de vedere clinic- practic, studiul nostru argumentează clar necesitatea folosirii de spermii menținute în mediu de cultură maxim 6-7 ore de la recoltare pentru asigurarea reușitei inseminării ovocitelor premature, maturate *in vitro*.
- ▶ Pe baza datelor noastre referitoare la ultrastructura spermilor am îmbunătățit protocolul, prin scăderea perioadei până la inseminare, fapt care a condus la creșterea ratei de reușită a fecundației cu un procent de 10%.
- ▶ Aspectele ultrastructurale ale ovocitului prematur ne indică procese de exocitoză care pledează pentru “imaturitatea” zonei pelucide, motiv pentru care ovocitele premature nu se fecundază.
- ▶ Aceste aspecte demonstrează pe de o parte participarea importantă a ovocitului la edificarea zonei pelucide și pe de altă parte necesitatea existenței unei zone pelucide “mature” (complet edificate) pentru a se realiza fecundația.

- ▶ Studiile ultrastructurale asupra ovocitelor premature, maturate *in vitro*, care demonstrează că ultrastructura lor este asemănătoare cu cea a ovocitelor mature maturate *in vivo*, sunt argumente importante pentru utilizarea acestora în procedeele de reproducere umană asistată.
- ▶ Rezultatele cercetărilor noastre asupra ovocitelor au condus la perfecționarea tehnicilor de cultivare a acestora, având ca rezultat obținerea unor embrioni de bună calitate , astfel că procentul de sarcini a crescut cu 2%, fiind similar procentelor de sarcini raportate de cele mai cunoscute laboratoare din domeniu din străinătate.
- ▶ Aspectele ultrastructurale descrise la diferitele tipuri de ovocite sunt argumente importante pentru a susține necesitatea perfecționării metodelor de stimulare ovariană pentru a se obține ovocite de o calitate foarte bună.
- ▶ Datele statistice pe care le-am realizat pe o perioadă de 10 ani, reprezintă prima cazuistică în domeniu de această anvergură în România.

Bibliografie selectivă:

1. Acosta A. A., Swanson J.R., Akerman B.S., Kruger T.F., Van Zyl J., Menkveld R., Human spermatozoa in Assisted Reproduction, Williams and Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney, 1990.
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc. New York & London, 1983.
3. Brindsten P, A textbook of in vitro reutilization and assisted reproduction, Parthenon Publishing Group, London, 1999.
4. Carlson B.M.: Human embryology & developmental biology, Mosby St. Louis Baltimore Boston Carlsbad Chicago Minneapolis New York Philadelphia Portland London Milan Sydney Tokyo Toronto, 2nd edition, 1999.
5. Checiu M., Schlehta S., Checiu I., Sandor S., In vitro studies on normal and pathological preimplantation development I. Events of normal mouse preimplantation development as revealed by microcinematography. Rev. roum. Morphol. Embrzol., vol. 30 pg. 101-111, 1990.
6. Crăciun C., Florea A., Dragoș N., Ardelean A.,: Introduction to cell and Molecular Biology, Cluj University Press, 1999.
7. Edwards RG: Maturation in vitro of human oocytes, Lancet, 1965.
8. Gardner D., In Vitro fertilization. A practical approach, Ed. Informa Healthcare, 2007.
9. Gasser R.F.: Atlas of Human Embryos, Medical Department Harper & Row Publishers, Hagerstone, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, London, 1975.
10. Gilbert S.F., Developmental Biology, Fourth Edition, Sinauer Associates, Inc. Pub, Sunderland, Massachusetts, 4th edition, 1994.
11. Guraya S.S.: Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals, Springer-Verlag, Berlin, 1987.
12. Levitas E, Lunefeld E, Weiss N, Friger M, Har-Vardi J, Koifman A, Potashnik G, Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples, Fertil Steril, vol. 83, pg. 1680-1686, 2005

- 13.Lopata A., Sathananthan H, McBain JC., Johnston WIH & Spiers AL (1980): The ultrastructure of the preovulatory human egg fertilized in *vitro*.Fertil.Steril, 33:12-20.
- 14.Moore K.L., Persaud T.V.N.:The developing human. Clinically oriented embryology,W.B. Saunders Company a division of Harcourt Brace and Company Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo 6th edition, 1998.
- 15.Moreno V., Balasch J., Vidal E., Calafell J.M., Civico S., Vanrell J.A., Air in the transfer catheter does not affect the succes of embryo transfer.Fertil Steril, vol.5, pg. 1366-1368, 2004.
- 16.Rabe T., Strowitzki T., Diedrich K., Manual on Assisted Reproduction, Ed. Springer, 2000.
- 17.Ralt D. et all.: Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, pp. 2840-2844, 1991.
- 18.Ranga V., Tratat de anatomia omului, vol.1, Ed. Medicală, București, pp.93-102, 1993.
19. Rogers B.J., Perreault S.D., Bentwood B.J., McCarville C., Hale R.W., Soderdahl D.W., Variability in the human-hamster in vitro assay for fertile evaluation, Fertil Steril, vol. 39, pg. 204-213, 1983.
- 20.Ross M.H., Romrell L.J., Kaye G.J., Histology-A text and atlas.Third edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo, A Valvery Company 1995.
- 21.Sathananthan H., Soon-Chye Ng., Bongso A., Trounson A., Ratnam S.: Visual Atlas of Early Human Development for Assisted Reproductive technology, University of Singapore, Singapore, 1993.
- 22.Sathananthan H., Bongso A., Ng SC., Ho J., Mok H., Ratnam SS (1990):Ultrastructure of preimplantational human embryos co-cultured with human ampullary cells.Human Reprod., 5:309-318, 1990.
- 23.Sathananthan H., Trounson A., Freeman L., Brady T.(1998):Morphology and fertizability of frozen human oocytes.Gamete Res., 16:177-186, 1998.
- 24.Sathananthan H., Trounson A., Wood C. (1986):Atlas of fine structure of human sperm penetration, eggs and embryos cultured in vitro.Gamete Res, 15:317-326, 1986.

25. Wennerholm UB, Bergh C., What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Hum Reprod vol 19, 1943-1945, 2004.

26. Wood E.G., Batzer F.R., Go K.J., Gutmann J.N., Corson S.L., Ultrasound guided soft catater embryo transfers will improuve pregnancy rates in in vitro fertilization. Hum Reprod vol. 15, pg. 107-111, 2000.

27. Xu M., Barret L., West-Farrell E., Kondapalli L., Kieseewetter S.E., Shea L., Woodruff T.K., In vitro grown human ovarian follicles from cancar patients support oocyte growth, Hum.Reprod., vol 24, pg.2531-2540 , 2009.