

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Lela R. Šurlan

**MOLEKULSKE I ULTRASTRUKTURNE PROMENE
TOKOM FRAGMENTACIJE
PREIMPLANTACIONIH HUMANIH EMBRIONA:
VEZA SA ZASTOJEM RAZVIĆA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Lela R. Surlan

**MOLECULAR AND ULTRASTRUCTURAL
CHANGES IN FRAGMENTED
PREIMPLANTATION HUMAN EMBRYOS:
RELATION TO EMBRYO ARREST**

Doctoral Thesis

Belgrade, 2014

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentori:

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Ivan Tulić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi Komisije:

dr Vesna Otašević, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu –

Institut za biološka istraživanja

„Siniša Stanković“

Bato Korać, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Beogradu, na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković. Rad je realizovan u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije broj 173054, a pod rukovodstvom dr Vesne Otašević.

Posebni izrazi zahvalnosti:

Zahvaljujem se profesorici dr Aleksandri Korać, na strpljivom i podsticajnom vođenju kroz izradu teze, prenetom znanju, bezrezervnoj podršci i svetlu tokom mog naučnog sazrevanja.

Zahvaljujem profesoru dr Ivanu Tuliću na mentorstvu i podršci tokom izrade rada, stvaranju dobrog okruženja i uslova za sprovođenje praktičnog dela rada i dragocenim stručnim savetima.

Zahvaljujem kolegama sa IBISS-a, profesoru dr Bati Koraću i dr Vesni Otašević, na velikoj i dragocenoj pomoći u toku izrade teze, kao i podsticajnoj znanstvenoj raspravi.

Zahvaljujem kolegama sa Biološkog fakulteta: Igoru Goliću, Milici Vučetić, Kseniji Veličković, Milici Markelić, Maji Bogdanović i Aniti Lazarević na dragocenoj stručnoj i tehničkoj pomoći tokom stvaranja rezultata.

Profesoru Radunoviću sam zahvalna na postojanom naučnom i stvaralačkom podstreku i poverenju.

Zahvalna sam svim radnim kolegama sa Odeljenja ART, pre svih Vesni Stanković, Jeleni Micić i Nadici Lukić, na podršci i pomoći u vreme izrade teze.

Moji prijatelji i porodica su me bodrili svo ovo vreme. Velika im hvala na tome.

Mojim roditeljima, koji su zaslužni za moja krila i otvoren um nikada se neću moći dovoljno zahvaliti, ali to činim i na ovaj način.

Na kraju, posebno sam zahvalna mom suprugu, Srđanu Avdiću, na svojoj ljubavi i beskrajnoj podršci.

Lela Šurlan

U Beogradu, 28. juna 2014.

*Ovaj rad posvećujem sjećanju na jednu izgubljenu zemlju i
našem jeziku koji nestaje i za kojim žalim,
u nadi da će na ovim ruševinama društva nastati bolji i čovječniji svijet.*

DRUGI PODACI O DISERTACIJI:

Naslov: Molekulske i ultrastrukturne promene tokom fragmentacije preimplantacionih humanih embriona: veza sa zastojem razvoića

Naučna Oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelije i tkiva

UDK Broj: [[576.311.347+576.311.333]:611.013.9]:611/612(043.3)

KLJUČNE REČI

IVF embrion, fragmentacija, mitohondrije, mtDNK, endoplazmin retikulum, azot oksid, redoks ravnoteža, oksidativna fosforilacija, kontrola kvaliteta.

REZIME DOKTORSKE DISERTACIJE:

Uvod: I pored visoko usavršenih tehnika vantelesne oplodnje morfološki savršeni embrioni nisu česta pojava. U kliničkoj praksi *in vitro* fertilizacije (IVF) oni u značajnoj proporciji dožive zastoj razvića ili pokažu morfološke nepravilnosti. U cilju postizanja viših stopa fertilizacije i dobijanja većeg broja kvalitetnih embriona u IVF centrima se, u uslovima standardizovane IVF kulture, temeljno prati razvoj IVF embriona, sprovodi njihovo ocenjivanje po kvalitetu. Fragmentacija embriona je veoma česta morfološka nepravilnost embriona i potvrđen znak snižene razvojne sposobnosti. Brojna populacija mitohondrija (Mt) ranih embriona je nosilac bioenergetskog potencijala i stecište signalnih puteva preživljavanja ćelija. Ove dve značajke su stoga odabrane za predmet istraživanja. U **cilju** što potpunijeg sagledavanja njihovog značaja za nastavak razvoja sprovedeno je ispitivanje na više nivoa: morfološkom, molekulskom i bioenergetskom. Primenom širokog raspona **metoda:** svetlosne, elektronske (TEM) i konfokalne mikroskopije, imunocitohemijske i transkripcione molekulske analize - na više nivoa su sagledane strukturne promene koje prate rano brazdanje i fragmentaciju, te povezivanje sa dinamikom i funkcionošću mitohondrija i sistema redoks ravnoteže embriona. Ispitivanje je odobreno i sprovedeno na suvišnim IVF embrionima, poklonjenim u naučno-istraživačke svrhe, po pribavljanju pisane saglasnosti obaveštenih pacijenata iz IVF programa.

Rezultati sa diskusijom: Rani embrioni pokazali su značajne ultrastrukturne promene skopčane sa fragmentacijom, prvenstveno na endoplazminom retikulumu (ER) i mitohondrijama (Mt) i to pregrupisanje, promene izgleda i blisku strukturnu vezu Mt sa ER često proširenih cisterni, koje su neretko zapremale veći deo fragmenata u vidu krupnih vakuola. Unutar embriona, po našim saznanjima prvi put, na TEM mikrografijama je pokazano postojanje i sekretovanje egzozoma, minijaturnih, membranskih vezikula - posrednika međućelijske komunikacije. Nadalje, primećeni su netipični kontakti jedra sa ER i Mt i potvrđeno postojanje više poznatih sistema uklanjanja i opravke oštećenih Mt (mitofagije, mitoptoze, fisije i fuzije...). Fluorescentno obeležavanje Mt

potvrdilo je njihovu veliku brojnost i sortiranje unutar embriona, u zavisnosti od stepena fragmentacije, kao i visok stepen kolokalizacije sa azot oksidom (NO). NO je, kao potentan signalni i redoks molekul značajno prisutan u posmatranim embrionima, i promenljiv u odnosu na kvalitet embriona. Proteini koji posreduju u remodelovanju Mt (mitofuzin 1, Drp1) pokazali su obrnut transkripcioni profil u odnosu na stepen fragmentacije: stišanost fisije i naglašenost fuzije kod umereno fragmentisanih embriona, te obrnut profil kod nekvalitetnih embriona. Ispitani su enzimi kompleksa oksidativne fosforilacije (OXPHOS), važnog činioca redoks ravnoteže ćelija, upoređim utvrđivanjem sadržaja njihovih iRNK kod kvalitetnih (A klasa), osrednjih i embriona lošeg kvaliteta. Transkriptomi OXPHOS embriona A klase su posmatrani kao "optimalni". U datom razvojnom prostorno-vremenskom okviru: stepen fragmentacije, mesto/značaj u respiratornom lancu i mesto porekla (jedrov ili Mt genom) transkripcioni profili komponenti OXPHOS, kao i ukupan sadržaj Mt DNK, pokazali su različite i osobene "transkripcione otiske" u odnosu na kvalitet embriona. Mitohondrijalno kodirani proteini ponašali su se različito u odnosu na jedarne: kod manje pogođenih embriona bili su transkripciono utišani, sa nižim sadržajem MtDNK u odnosu na A embrione. Nekvalitetni embrioni su imali obrnut transkripcioni profil. Sa obimom fragmentacije rasli su pokazatelji ćelijskog stresa: ekspresija ATP sintaze, nekih enzima koji proizvode reaktivne vrste azota (NOS) i kiseonika (NOX) i okidače apoptotske ćelijske smrti (citohrom c). **Zaključno**, sumirani rezultati govore da su embrioni u ovom periodu izloženi visokom razvojnom i pritisku okruženja i da očekivano pribegavaju rešenjima koja, u poređenju sa „običnim“ ćelijama izgledaju ekstremno. U manje pogođenim embrionima to rezultuje oporavkom i dobrim stopama usađivanja. Svi embrioni pokreću usađene programe samo-obnavljanja, iako nakupljeni stres katkad dovodi do potpunog i metabolički manje ili više "tihog" zastoja u razviću.

Ovaj rad pružio je nove uvide u razvojni potencijal ranih embriona, i može poslužiti kao bazična biološka platforma za dalje kliničke studije.

ADDITIONAL DISERTATION DATA:

Thesis Title: Molecular and Ultrastructural Changes in Fragmented Preimplantation Human Embryos: Relation to Embryo Arrest

Academic expertise: Biology

Field of academic expertise: Cell and Tissue Biology

UDK No: [[576.311.347+576.311.333]:611.013.9]:611/612(043.3)

KEY WORDS:

IVF embryo, fragmentation, mitochondria, MtDNA, endoplasmic reticulum, nitric oxide, red-ox balance, oxidative phosphorylation, quality control

DISSERTATION ABSTRACT

Intro: Despite applying highly sophisticated ART techniques, perfect human IVF embryo is rarely seen: high proportion of IVF embryos experience embryo arrest or develop certain morphological irregularities. In order to obtain better fertilization rates and get more top quality embryos, IVF centers are performing standardized IVF culture; observe embryo development and carry out embryo scoring. Embryo fragmentation, as a very common morphological abnormality, is positively correlated with impaired developmental potential. Mitochondria (Mth), power stations and merging points of cell survival signaling pathways, are extremely abundant in early embryos. We elected those features as a subject of our study, **aiming** to clarify their true relevance in developmental sequence. Spectrum of **methods:** light, electron and confocal microscopy, immunocytochemistry and gene transcriptome analysis have encompassed morphological, molecular and energy balance features of early fragmented embryos and enabled us to grasp ultra-structural changes of fragmented cleavage embryos and correlate them with Mth dynamics, Mth functionality and embryonic energy balance. Study has institutional review board approval, and has been conducted on surplus IVF embryos donated for science, with written informed consent provided from couples.

Results and Discussion: Early embryos exhibit distinctive ultrastructural changes associated with blastomere fragmentation, mainly on endoplasmic reticulum and mitochondria. We observed particular Mth sorting, change in appearance and very close contact with ER whose cisterns are often enlarged to the size of large vacuoles, especially in embryo fragments. To our knowledge, we were the first to observe exosomes on TEM micrographs of early human embryos. Exosomes are known micro-vesicular mediators of intercellular communication. We also observed: atypical proximity of nucleus, Mth and ER; few known Mth quality control pathways, like mitophagy, mitoptosis and remodeling by fusion and fission. Fluorescent labeling of functional Mth confirmed their great abundance within embryo, altered distribution patterns in relation with degree of fragmentation, and strong co-localization with nitric oxide (NO). This very important signaling molecule within biological systems,

showed its elevated production in early embryos, correlated with the degree of fragmentation. Proteins which mediate mitochondria fusion and fission (Mitofusin 1; Drp 1), have shown different transcription profiles in relation to fragmentation degree. Good and low-fragmented embryos exhibit enhanced fusion/suppressed fission profile, and poor quality embryos show the opposite transcription profile. Being a pillar of cell power and redox balance, the complex of oxidative phosphorylation (OXPHOS) is assessed with the same molecular tools. We considered the best embryo's OXPHOS transcriptome as optimal and, in a given spatial and temporal developmental frame: fragmentation degree, position and relevance in the respiratory chain and genomic origin (nuclear or Mth gene), transcription profile of OXPHOS components and MtDNA content show specific "fingerprint" associated with embryo quality. Mitochondrial encoded proteins exhibited low transcription profile in low fragmented embryos, joined with low MtDNA copy number. Poor quality embryos show the opposite transcriptomic scenario and possess elevated number of MtDNA copies. Nuclear encoded components follow different gene expression patterns, also sensitive to the occurrence of fragmentation. Some mediators of oxidative stress increased with degree of fragmentation: expression of ATP synthase, especially in low fragmented embryos; reactive oxygen species (expression of NOX); reactive nitrogen species (expression of NOS); triggers of apoptosis (expression of *cytochrome c*).

To conclude, our summarized results point out that all early embryos are exposed to a great developmental and environmental pressure, and, accordingly, they reach for solutions which, compared to other cell types, look the very utmost. Those measures are more efficient in minor and medium than severe affected embryos, so the recovered embryos had good implantation rates. All of them mobilize inherent repair programs, but accumulated stress sometimes leads to, metabolically more or less "quiet", permanent embryo arrest.

This work offers some new insights into developmental capacity of early embryos and could be used as a basic science research platform for further clinical studies.

SADRŽAJ

1. U V O D	1
1.1 IVF i ART	1
1.2 Fragmentacija embriona- klinički aspekti	2
1.3 Fragmentacija embriona - biološki aspekti	3
1.4 Fragmentacija embriona - subćelijski i bioenergetski aspekti	5
1.5 Značaj Mt u životu i smrti ćelije - stecište signalnih puteva	6
1.6 Značaj reaktivnih vrsta kiseonika i azota u životu i smrti ćelije - vesnici i pokretači puteva preživljavanja	10
1.7 Objedinjavanje bazičnih i kliničkih nauka u oblasti ART	12
2. C I L J	13
3. M A T E R I J A L I M E T O D E	15
3.1 Prikupljanje i priprema uzoraka	15
3.2 Svetlosna mikroskopija	18
3.3 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)	18
3.4 Konfokalna mikroskopija	20
3.4.1 Bojenje Mt embriona MitoTracker Green FM (MT-G) i MitoTracker Orange CMTM Ros (MT-orange)	20
3.4.2 Bojenje 4,5-Diaminofluorescein diacetatom (Daf2-DA) za detekciju NO	21
3.5 Imunohistohemijska detekcija proteina	22
3.5.1 Streptavidin-biotin metoda imunohistohemijske detekcije	22

3.6	Imunocitohemijska detekcija proteina	23
3.7	Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (RT-PCR)	23
3.8	Statistička obrada rezultata	27
4	REZULTATI	28
4.1	Rezultati posmatranja na svetlosnom mikroskopu	28
4.2	Rezultati posmatranja ultrastrukture embriona na TEM	32
4.2.1	Opšta zapažanja o vezi blastomera i fragmenata	32
4.2.2	Prisustvo proširenih cisterni/vakuola unutar fragmenata	36
4.2.3	Prisustvo Mt izmenjenog izgleda unutar fragmenata i na obodima blastomera	39
4.2.4	Neposredna veza Mt izmenjenog izgleda sa jedrom	39
4.2.5	Analiza sadržaja međublastomernog prostora – više od detritusa, manje od jasne uloge	44
4.2.6	Pojava multivezikularnih telašaca i otkriće egzozoma kod ranih embriona	44
4.3	Rezultati posmatranja celih embriona na konfokalnom mikroskopu – raspored i međuodnos Mt i NO	47
4.3.1	Prisustvo i raspored Mt unutar embriona različitog kvaliteta	47
4.3.2	Prisustvo i lokalizacija NO unutar embriona različitog kvaliteta	48
4.3.3	Kolokalizacija Mt i mesta gde je prisutan NO	48
4.4	Rezultati imunohistochemijskog obeležavanja izoformi NO sintaze (iNOS, eNOS, nNOS) na polutankim presecima	53
4.5	Rezultati imunocitohemijskog obeležavanja ATP sintaze na tankim presecima	54

4.6	Rezultati molekulskih ispitivanja embriona na nivou ekspresije gena koji su od značaja za redoks ravnotežu	55
4.6.1	Genska ekspresija eNOS – rezultati poređenja na nivou stepena fragmentacije embriona	55
4.6.2	Promene ekspresije gena koji kodiraju komponente respiratornog lanca – rezultati poređenja na nivou stepena fragmentacije embriona	56
4.6.3	Ukupan sadržaj MtDNK kod embriona različitog kvaliteta	58
4.6.4	Ekspresija gena koji regulišu remodeliranje Mt (proteini regulatori fuzije i fisije mitohondrija)	58
4.6.5	Ekspresija gena NADPH oksidaze (NOX4)	59
5.	DISKUSIJA	60
5.1	Diskusija ključnih rezultata	60
5.2	Klinički i patofiziološki značaj rezultata rada	68
6.	ZAKLJUČAK	70
7.	LITERATURA	73

BIOGRAFIJA AUTORA

PRILOZI:

1. Izjava o autorstvu
2. Izjava o istovetnosti
3. Izjava o korišćenju

(Napomena: u Sadržaju je korištena skraćenica Mt za mitohondrije)

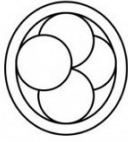

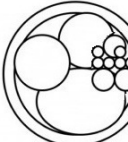

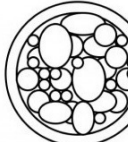
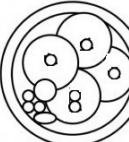
1. UVOD

1.1. IVF i ART

Poduhvat koji je završen rođenjem prve „bebe iz epruvete“ započeo je tehnološku eru *in vitro* fertilizacije (IVF) te daljeg razvoja i široke primene *asistiranih reproduktivnih tehnologija* (ART). Klinička istorija mu je dovoljno duga da se danas tim povodom pišu i istorijski pregledi (Kamel, 2013). I pored značajnog poboljšanja uslova gajenja gameta i embriona *in vitro*: upotrebe vrhunskih biotehnoloških protokola i uređaja, IVF odobrenih sudova i hranljivih tečnosti (medijuma), primene visokih standarda kontrole kvaliteta – morfološki savršeni IVF embrioni nisu česta pojava.

Postoji nekoliko sistema ocene kvaliteta IVF embriona. U osnovi subjektivno posmatranje, usklađeno sa normama kliničke embriologije, svodi se na beleženje: broja i izgleda ćelija embriona, međusobno poređenje veličine blastomera, simetrije i dinamike deoba te praćenje prisustva i broja jedara u blastomerama - nukleacije (ALPHA Scientists i ESHRE SIG Embryology, 2011., Veek i Xenakis, 1986., Steer i sar. 1992.). IVF praktičari su u stalnoj potrazi za novim varijablama za ocenu embriona (Vergouw i sar., 2013., Yang i sar., 2014.).

U praksi, ocenjivanje embriona (engl. *embryo scoring*) se zasniva pretežno na dva ključna pokazatelja: broj blastomera u datom trenutku ocenjivanja (merilo dinamike i pravilnosti deoba) i uočavanje fragmentacije embriona (**Shema 1**). Shodno tome, nepravilnosti u razvoju IVF embriona koje se uočavaju pre stupnja blastociste su: nepravilna i/ili zakasnela deoba, pojava citoplazmatske fragmentacije, pojava multinukleacije i zastoj u razviću, (engl. *embryo arrest*), koji su pokazani na **Slici 3**. Sistem ocenjivanja neophodan je u cilju odabira najboljih embriona za *embriotransfer* (polaganje embriona u šupljinu materice) i *krioprezervaciju* (pohranjivanje kvalitetnih embriona u tečni azot radi kasnijeg transfera), kao i za stalnu procenu kvaliteta ART postupaka.

A	A*	B	C	D	D
					
JEDNAKE BLASTOMERE BEZ FRAGMENTATA	JEDNAKE ILI UMERENO NEJEDNAKE BLASTOMERE BLAGA FRAGMENTACIJA do 10%	JEDNAKE ILI UMERENO NEJEDNAKE BLASTOMERE FRAGMENTACIJA od 11 - 25%	NEJEDNAKE BLASTOMERE IZRAŽENA FRAGMENTACIJA 25% i više	NEPREPOZNLJIVE BLASTOMERE POTPUNA FRAGMENTACIJA	MULTINUKLEACIJA bez obzira na simetričnost deoba i fragmentaciju

Shema 1. Ocenjivanje embriona po kvalitetu. Crtež, prilagođeno po UCONN.

1.2. Fragmentacija embriona – klinički aspekti

Pojava fragmentacije tokom prvih deoba brazdanja je uobičajena i neretko prolazna pojava koja prati razvoj embriona, tj. većina IVF embriona pokazuje fragmentaciju, u manjoj ili većoj meri (Alikani, 2007.). Fragmentacija izražena u većoj meri, koja je praćena gubitkom jedne ili više blastomera nedvosmisleno je povezana sa smanjenjem pa i gubitkom razvojnog potencijala embriona (zastoj razvića). Sposobnost razvoja u blastocistu kod takvih embriona je umanjena, kao i šanse za uspešno usađivanje. Stepem fragmentacije transferisanih embriona je u obrnutoj korelaciji sa stopom implantacije i stopom kliničkih trudnoća (Ebner i sar., 2001.). Suprotno tome, veza fragmentacije i ostalih kliničkih ishoda još uvek je nerazjašnjena i nije pronađena jasna veza sa nizom drugih kliničkih parametara trudnoće: stopama komplikacija trudnoća, učestalošću višestrukih trudnoća, učestalošću porođaja carskim rezom, nedeljom porođaja, težinom novorođenčadi, godinama starosti pacijentkinje... Neke studije pokazale su da trudnoće dobijene iz embriona veoma lošeg kvaliteta imaju veću učestalost urođenih deformiteta, što su pokazali Ebner i sar. (2001.) i spontanih pobačaja (Alikani i sar., 2008.). Većina studija ipak nije pokazala jasnu pozitivnu korelaciju između fragmentacije embriona i loših kliničkih ishoda IVF: povećane učestalosti biohemijskih trudnoća te stopa spontanih pobačaja (Giorgetti i sar., 1995., Shen i sar., 2005). Iskustva iz prakse

ne ostavljaju mesta optimizmu kada su za vraćanje raspoloživi samo nekvalitetni embrioni, ali su i iz takvih embriona dobijane trudnoće koje su završene rođenjem zdrave bebe. Valja dodati i da se morfološki savršeni embrioni katkad ne implantiraju ili zastanu sa deobama još ranije, u *in vitro* kulturi.

Klinike za infertilitet i embriološke laboratorije su mesta gde se, što je i etički i zakonski obavezno, čini sve da do razvoja embriona i trudnoće dođe. To znači da se embrioni ne izlažu uslovima koji mogu omesti njihov razvoj, osim u meri u kojoj je to neophodno (potpomognuta oplodnja, ocenjivanje, premeštanje). Samim tim je uspostavljanje veze između kratkog posmatranja embriona pod svetlosnim mikroskopom, njegovog razvojnog potencijala i svih kliničkih ishoda IVF – pojednostavljen i spekulativan zadatak. Suštinsko razumevanje razvojnih opterećenja koja mogu dovesti do poremećaja i zastoja u razviću zahteva potragu za njihovim unutrašnjim uzrocima i ogradu kod korišćenja termina „abnormalan/normalan“ embrion (Hartshorne, 2000.).

1.3. Fragmentacija embriona – biološki aspekti

Fragmenti embriona su membranom uspostavljena, anukleusna i plejomorfna telašaca ispunjena citoplazmom i organelama. Stvaraju se na račun ćelijskog sadržaja blastomera. Širenjem ovog procesa remeti se simetrija unutar embriona i zavisno od stepena zahvaćenosti smanjuje se zapremina pojedinih blastomera, što je pokazano u nekim morfometrijskim studijama, te podstaklo autore, Hnida i sar. (2004.), da računarsko preračunavanje ukupne zapremine blastomera predlože za procenu stepena fragmentiranosti.

Nov pristup u izučavanju ove pojave omogućile su „*time lapse*“ kamere prilagođene IVF inkubatorima, čiji su ubrzani spojeni foto-zapisi otkrili neverovatno visoku dinamičnost fragmenata: njihovu značajnu pokretljivost unutar embriona, brzi nestanak (resorpciju od strane blastomera) u razmacima od par minuta, ali i razvojni scenario kada njihova postojanost i progresivno

širenje zahvataju više blastomera pa i ceo embrion. Morfokinetičke studije koje se danas sprovode uz pomoć analize video-zapisa koriste se za bolje predviđanje razvojnog potencijala embriona (Herrero i Meseguer, 2013., Mio i Maeda, 2008.). Fragmentacija združena sa nastavkom deoba brazdanja, uz resorpciju fragmenata ili ne, sama po sebi nije letalna.(Van Blerkom i sar., 2001.).

Stepen fragmentacije se obično izražava u procentima zapremine embriona zahvaćene fragmentacijom. U literaturi je opisano je nekoliko tipova fragmentacije. Od značaja za sistematizaciju bili su veličina (sitni ili krupni fragmenti) i pozicija većine fragmenata (da li su pretežno u sredini ili po obodima embriona), njihova brojnost i tip raširenosti u okviru embriona (skupljeni na jednom mestu ili pretežno razbacani; da li pri tom zahvataju jednu ili više blastomera), (Alikani i sar., 1999., Antczak i Van Blerkom, 1999.).

Mišljenja o sposobnosti oporavka i nastavka razvoja embriona s fragmentacijom su uglavnom podeljena, a broj studija koja rasvetljavaju detalje ove pojave i njenu fiziološku osnovu je nesrazmeran značaju problema. Pregledi koji govore o kliničkom značaju fragmentacije su brojni (Alikani i sar., 1999., Alikani i sar., 2000., Ebner i sar.2001., Fujimoto i sar., 2011.). Pre svega, embriolozima i stručnoj javnosti je dostupan izuzetno mali broj objavljenih, a upotrebljivih elektron-mikrografija ranih embriona, uključujući skromne početke, kod Esterhuizen i sar. (1998.), dosta studija na životinjama gde ističemo Rivera i sar. (2003.) i Bettencourt i sar.(2009.), i svega nekoliko novijih radova na humanom materijalu, gde se ističe pregled Sathananthana i sar. (2013.).

Suprotno tome, studije o morfologiji oocita i sledstveni kriterijumi za njihov fertilizacioni potencijal izuzetno su brojne i Rienzi i sar. (2011.) dala je dobar pregled te literature. Neposredna veza kvaliteta oocita sa kvalitetom embriona je opšteprihvaćena. Dok neke studije ukazuju na povezanost morfologije oocite i fragmentacije embriona, kao Xia (1997) i Ebner (2002.) -

postoje i zvanični konsenzusi stručnih udruženja koji tvrde da izgled oocite (većina unutrašnjih morfoloških karakteristika: vakuole, granulacija, tamne inkluzije itd, a pogotovu ekstracitoplazmatski dismorfizmi: izgled polarnog tela, perivitelinskog prostora i *zona pellucida*) nisu sigurni u predviđanju razvojnog kapaciteta embriona (Istanbul Consensus, 2011.). Pregledi objavljenih istraživanja ovu vezu pojašnjavaju kao složen odnos citoplazmatske i jedarne kompetentnosti oocite i razvojnog kapaciteta embriona (Fujimoto, 2011.). Upravo ovakav „koncept“ naglašava potrebu za obimnijim proučavanjem embriona na subćelijskom, molekulskom nivou, kao i na nivou bioenergetike blastomera.

1.4. Fragmentacija embriona – subćelijski i bioenergetski aspekti

Posmatranje i ocena izgleda ranih embriona pomoću stereomikroskopa ili invertnog mikroskopa u IVF laboratoriji (pri uvećanjima od 10 do 400x) samo delimično odražava njihov kvalitet. Kako nemamo uvid u očuvanost temeljnog *molekulskog nasleđa* novog embriona, spojenih jajne ćelije i spermatozoida – ne možemo suštinski govoriti o embrionovoj početnoj sposobnosti za dalji razvoj. Analize hormonskog statusa oba partnera ne govore sa sigurnošću o šansama za dobijanje kvalitetnih gameta.

Korak bliže, metabolomske analize folikularne tečnosti, sperme, analize kapi kulture u kojoj su embrioni boravili su jednako posredni pokazatelji sposobnosti za dalji razvoj. Dosadašnja istraživanja i posmatranja stvorila su neku vrstu platforme za dalje vrednovanje kompetentnosti embriona – definisani su neki međuodnosi, činioci i nepravilnosti na subćelijskom i molekulskom nivou. Čest cilj istraživanja bili su: status hromozoma (Magli i sar., 2007., Munne, 2006.); odnos fragmentacije i faze ćelijskog ciklusa (Alikani i sar., 2005.); značaj mitotske aktivnosti ćelija te dinamike i organizacije citoskeleta (Alikani i sar., 2005., Neganova i sar., 2000.); veza fragmentacije i apoptoze (Jurisicova i sar., 1996., Jurisicova i Acton, 2004.); značaj integriteta

membranskih sistema, i to odnosa njihovih lipidnih komponenti kao i prisustva i rasporeda regulatornih i drugih proteina membrane (Antczak i Van Blerkom, 1999., Comiskey i Warner, 2007, Ng i sar., 2005.) - pri čemu su dobijeni značajni rezultati i otvorena nova pitanja. Unutar pomenutog istraživačkog mozaika - načini očuvanja metaboličke i bioenergetske stabilnosti embriona i blastomera tokom energetske zahtevnih deoba brazdanja su samo delimično rastumačeni. Njihov značaj u periodu pre aktivacije embrionovog genoma je dodatno podsticajan istraživački cilj. Znamo da su energetska ravnoteža (homeostaza), međucelijska komunikacija i neprekidna razmena informacija sa okruženjem imperativi razvoja i opstanka uopšte, i pri svemu tome rani embrion raspolaže isključivo majčinim nasleđem DNK prepisa (iRNK) i mitohondrija.

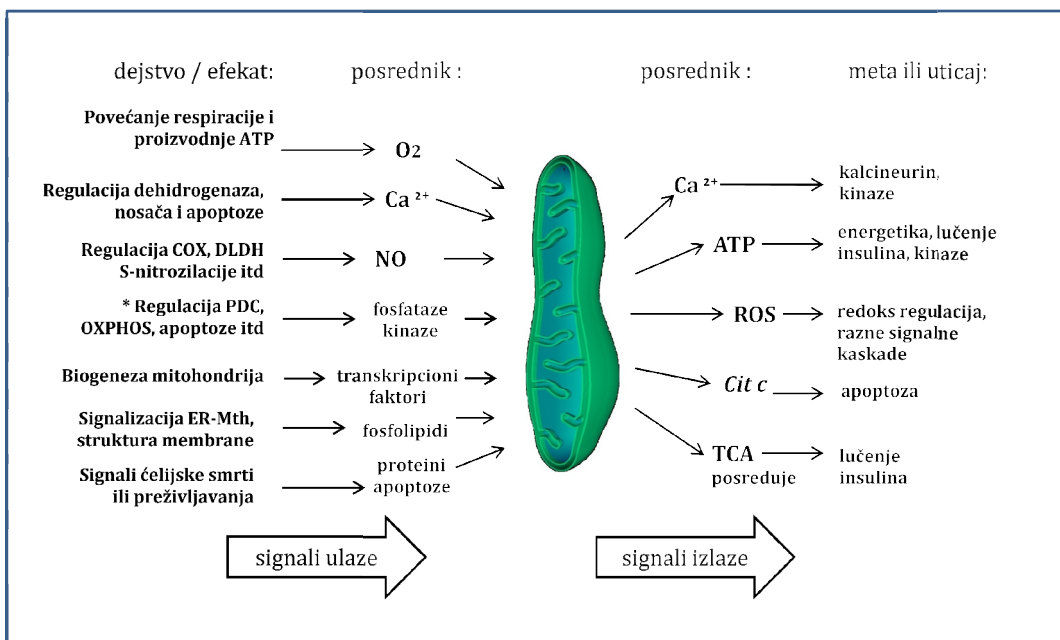
1.5. Značaj mitohondrija u životu i smrti ćelije - stecište signalnih puteva

Embrion od jajne ćelije nasleđuje izuzetno veliku populaciju mitohondrija (nekoliko desetina hiljada) i ona se tokom deoba brazdanja razdeljuje među blastomerama, preuzimajući ključnu, vitalnu ulogu u životu preimplantacionih embriona (Van Blerkom, 2000.). Pri tom se mitohondrije u prvim danima razvića ne umnožavaju i ne poseduju punu fiziološku kompetentnost. Smatra se se da do perioda implantacije nema novog umnožavanja niti prepisivanja mtDNK (Jansen i de Boer, 1998., Ramalho-Santos, 2009., Cummins, 2004.).

Osim proizvodnje i pretvaranja energije, mitohondrije regulišu razvojne procese i podešavaju ćelijske signalne puteve na više načina: Ca^{2+} zavisnom signalizacijom, biohemijskim putevima upravljanim i posredovanim reaktivnim molekulskim vrstama i značajnim učešćem u okidanju apoptoze (Dumollard i sar., 2007., Van Blerkom, 2004., Hardy i sar., 2003., Rizzuto i sar., 2004., Romagnoli i sar., 2007., Chen, 2001.).

Shema 2. prikazuje višestruko delovanje ćelijskih molekulskih signala na mitohondrije i njihov odgovor, samo delom pokazujući složenost i preplitanje

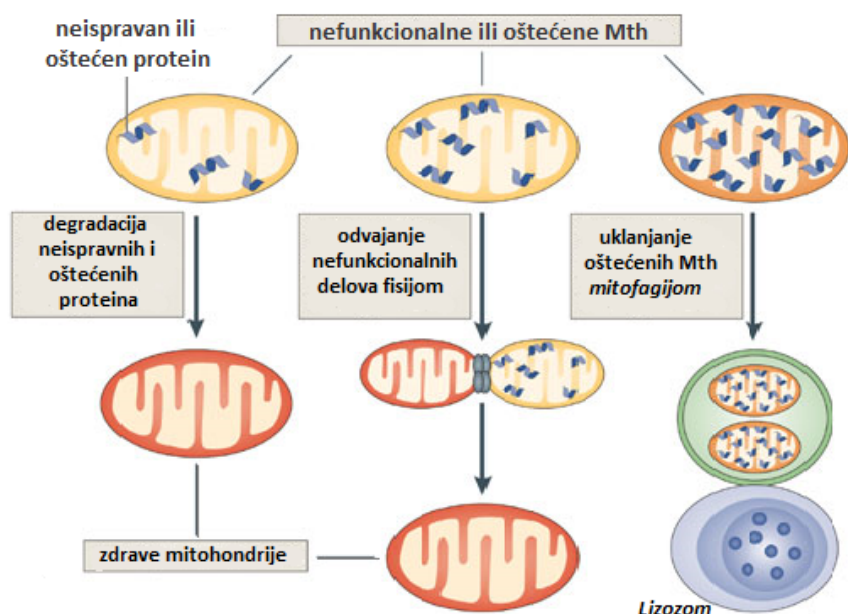
više metaboličkih puteva i značaj mitohondrija kao integrativnog centra. Ovakva uloga podržana je mnoštvom molekulskih posrednika: proteina, transkripcionih faktora, fosfolipida, metabolita, jona, gasova, idući od krupnijih, sve do nivoa brzih, slobodno-prodirućih gasova, kakav je azot oksid (NO). Dodatno, svi pobrojani nosioci signala, zajedno sa makromolekulskim sistemima kao što su polarizovane membrane, fotoaktivni hromatin i, ponovo, polarizovane mitohondrije - dodatno odgovaraju na uticaje okružujućeg elektromagnetnog spektra što celu sliku održanja vitalnosti ćelije dodatno obogaćuje (Popp i sar. 1992., Levin, 2013., Cohen i Popp, 2003., Yamskova, 2010.)



Shema 2. Uloga mitohondrija u ćelijskim signalnim putevima; preuzeto i prilagođeno, Pagliarini et al. (2006).

Ćelijski mehanizmi koji leže u osnovi fragmentacije IVF embriona, a koji uključuju mitohondrije kao regulatorni centar nisu dovoljno rasvetljeni, opterećeni su oprečnim nalazima i nedostatkom sumirajućih zaključaka. Dosta pažnje posvećeno je ispitivanjima membranskog potencijala mitohondrija ranih embriona, gde se ističu Arnoult (2007.) i Acton i sar.(2004), ipak bez pružanja temeljnih saznanja o drugim parametrima funkcionalnosti mitohondrija.

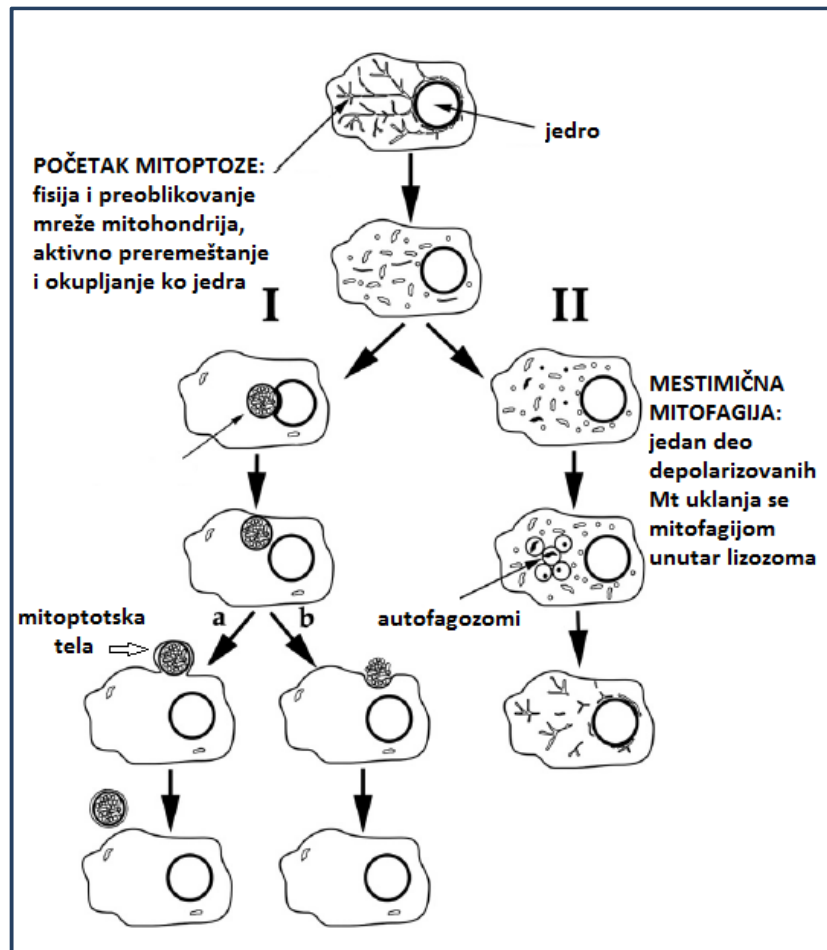
Regulacija raspoređivanja po blastomerama, pokazani kod Wilding i sar.(2001.) i Wang i sar. (2009.), postojanje aktivnog sistema uklanjanja „loših“ mitohondrija, opisano kod Lyamzaev i sar. (2008.) kao i Tolkovsky (2009.) su samo donekle proučeni i danas pobuđuju posebnu istraživačku pažnju i rasprave. **Shema 3.** prikazuje sadejstvo više mehanizama u misiji obezbeđivanja zdrave populacije mitohondrija. U zavisnosti od stepena oštećenja i ostalih unutarćelijskih i signala iz okoline slede: unutrašnje popravljanje grešaka, oporavak putem fuzije sa zdravim mitohondrijama, fisija mitohondrije sa odvajanjem oštećenog dela i konačno kod visokog stepena oštećenja – put obeležavanja za potpuno razlaganje posredstvom lizozomskog sistema (autofagija mitohondrija, mitofagija).



Shema 3. Putevi kontrole kvaliteta mitohondrija (Mth), prilagođeno, Sheng i Cai (2012).

Ključni proteini koji učestvuju u kontroli kvaliteta mitohondrijalne populacije, regulišući njihovo remodeliranje putem fisije (podele i fragmentacije) i fuzije (interventnog stapanja koje doprinosi njihovom oporavku i respiratornoj zaštiti) su Drp 1 i mitofuzin 1, tim redom.

Ovome se može dodati i mitoptoza kao ne tako davno opisan alternativni put uklanjanja mitohondrija, koji ne počiva na lizosomnoj autofagiji, već na aktivnom premeštanju, okupljanju i posebnom putu razlaganja mitohondrija (pojavi mitoptotskih tela koja se odstranjuju iz ćelije), **Shema 4**. Ovaj scenario je na delu kada ukupne promene zahtevaju brzu i masovniju „popravku“ mitohondrija kod ćelija koje su bile izložene jakom oksidativnom pritisku. Pretpostavlja se da visoke količine reaktivnih vrsta stvorene u takvim prilikama, ukoliko to i drugi signali i ćelijski resursi dozvole – pokreću ovaj program, koji po svojim morfološkim odlikama u mnogome podseća na „apoptozu unutar ćelije“, omogućavajući njeno preživljavanje odstranjivanjem svih „problematičnih“ mitohondrija.



Shema 4. Put mitoptoze, po Skulacevu (2008), preuzeto i prilagođeno.

1.6. Značaj reaktivnih vrsta kiseonika i azota u životu i smrti ćelije - vesnici i pokretači puteva preživljavanja

Duž reproduktivnog puta žene, jednako kao i u drugim tkivima, postoje razlike u fiziološkim koncentracijama kiseonika (Gardner, 2013.). Parcijalni pritisak kiseonika, koji se počev od folikula, niz jajovod pa sve do šupljine materice menja samo je jedan od modulatora sazrevanja oocita i dinamike ranog embrionalnog razvoja (Nagy i sar., 2012.).

U veštačkim sistemima , kao što je gajenje gameta i embriona u IVF laboratoriji ove fiziološki podešene i blage promene oksidativnog okruženja, dobijaju potpuno drugačiju - uvećanu i promenljivu amplitudu!

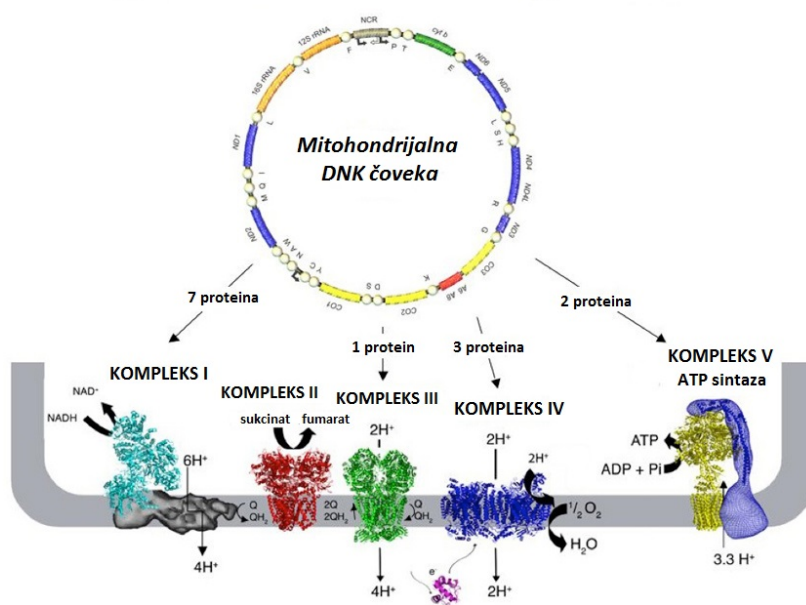
Prilikom aspiracije i pregleda folikularne tečnosti pod mikroskopom, u prvim minutima boravka u sredini sa 21% kiseonika, oocite su izložene snažnom oksidativnom pritisku. Potom se podvrgavaju biotehnološkim postupcima i ponavljano izlažu uslovima izvan inkubatora, promenama temperature i osvetljenja. Isti režim se primenjuje i kod gajenja embriona u narednim danima IVF kulture - i oksidativni stres je prepoznat kao značajan činilac u dinamici ranog razvoja (Bedaiwy i sar., 2010., Jana i sar., 2010.).

Uloga reaktivnih vrsta kiseonika (*engl.*, reactive oxygen species, ROS) i azota (*engl.*, reactive nitrogen species, RNS), pre svega NO i superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$), u pre-embriionalnom periodu razvoja je posebno kontraverzna (Bedaiwy i sar., 2004., Skulachev 2006.).

Dodatno, i oksidativna fosforilacija (OXPHOS), koja se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija je dobila zasluženno mesto - mitohondrije nisu samo ćelijske „toplane“ već se i mašinerija OXPHOS postavlja u središte homeostatskih regulatornih zbivanja. Kompleks proteina koji obavlja ovaj niz biohemijskih procesa i omogućava stvaranje protonskog gradijenta sa dve strane unutrašnje membrane mitohondrija (kompleksi I, II, II, IV, citohrom c i ATP sintaza kao kompleks V, **Shema 5.**) je takođe „efektor“ - ciljno mesto redoks regulacije.

Ključnim procesom regulacije aktivnosti proteina smatra se reverzibilna fosforilacija i zapanjujuća je činjenica da mitohondrije operišu sa preko 60 fosfo-proteina (od toga je tridesetak kinaza i fosfataza, a među njima je nekoliko proteina iz svake od komponenti OXPHOS kompleksa, zatim Mn superoksid dismutaza, kao i brojni proteini koji učestvuju održavanju i transkripciji mitohondrijalne DNK (mtDNK), metabolizmu aminokiselina, sintezi steroida, glicerolipida, osmoregulaciji, detoksikaciji, apoptozi... (Pagliarini i Dixon, 2006.)

Mitohondrijalna DNK i oksidativna fosforilacija



Shema 5. Komponente elektron-transportnog lanca (kompleksi I - IV sa ATP sintazom) i pregled mitohondrijalnog genoma čoveka, Preuzeto i prerađeno iz projekta *Mitochondrial biogenesis and disease*, MRC National Institute for Medical Research, London, <http://www.nimr.mrc.ac.uk/>

Sadejstvujući, fosforilacija kao podesiv i pre svega reverzibilan vitalni proces i svi nabrojani činiooci - deo su velikog mozaika upravljanja i održanja redoks ravnoteže ćelija. Značaj koji ovaj mozaik ima za pitanje opstanka i prilagođavanja embriona u novoj i promenljivoj sredini nije potrebno posebno naglašavati.

1.7. Objedinjavanje bazičnih i kliničkih nauka u oblasti ART

Embrioni čoveka koji od prvog do najduže 5 ili 6 dana borave u ćelijskoj kulturi, nalaze se u kritičnom periodu ne samo što se tiče prostog obezbeđivanja smene deoba i interfaze. U ovom periodu se vrši uključivanje genoma embriona (u stupnju između 4 i 8 ćelija), odvija se prelaz sa maternalnih na embrionalne prepise DNK, i pri tom se vrši temeljna epigenetska dorada genoma (Hartshorne, 2000.) kao i prelaz sa metabolizma piruvata i laktoze na potrošnju glukoze (Gardner, 2013.). Stoga su prve blastomere embriona u biološki nezavidnom položaju: totipotentne su i nose u sebi plan dovoljan za razviće cele jedinke i istovremeno su izuzetno osetljive i otvorene za spoljne uticaje.

Sve ove činjenice zajedno ističu značaj upoznavanja ćelijskih, subćelijskih i molekulskih promena koje leže u osnovi fragmentacije embriona. Budućim kombinovanjem neinvazivnih tehnika očitavanja metaboličkog „zdravlja“ embriona, čiji je pregled dao Sakkas (2014.), (što je danas moguće *in vivo* i bez vremenskog otklona u tehnološki naprednijim IVF centrima) sa saznanjima o subćelijskoj arhitekturi i molekulskom metaboličkom „otisku“ embriona, zaustavljenih u tom istom razvojnem periodu – bilo bi moguće utvrditi nove, nedvosmislenije i klinički značajne markere kvaliteta embriona. U laboratorijskoj praksi to bi značilo i sigurnije parametre za odabir najboljih embriona za transfer odnosno krioprezervaciju – nove, pouzdanije i neposrednije markere razvojne sposobnosti ili rečju, vitalnosti ranih embriona. Studija poput ove može doprineti naporima u tom smeru.

2. CILJ RADA

Centar ovog istraživanja postavljen je u kontekst sveopšteg i multidisciplinarnog dopunjavanja mozaika embriologije čoveka, prvenstveno najranijeg – preimplantacionog perioda. Razvojem i primenom tehnologije *in vitro* fertilizacije, odnosno biomedicinski potpomognutog oplođenja (BMPO) ovaj segment razvojne istorije čoveka postao je direktno vidljiv i manje ili više dostupan naučnoj i stručnoj zajednici.

Zbog potrebe za stalnim poboljšavanjem uslova IVF kulture i u cilju dobijanja što kvalitetnijih embriona i povećavanja šansi za trudnoću stvoren je uzajamno podsticajan i uslovljen odnos biomedicinske tehnologije i bazičnih bioloških disciplina.

Posmatranjem *arhitekture* ranih humanih IVF embriona u dvojakom svetlu – *morfološkom* (utvrđivanje detalja ultrastrukture) i *funkcionom* (utvrđivanje molekulskih i redoks parametara) omogućio bi se uvid u osobenosti ove *specifične opservacione kohorte*, te bi ova studija mogla doprineti poznavanju osnovnih mehanizama održavanja homeostazisa tokom perioda oplodnje i brazdanja ljudskih embriona uopšte.

Cilj istraživanja je upoznavanje sa detaljima ultrastrukture (prisustvo, raspored i morfologija organela u blastomerama i, posebno, fragmentima, razjašnjavanje visoke promenljivosti i pokretljivosti fragmenata) i molekulskim pokazateljima bioenergetskog statusa preimplantacionih embriona (između ostalog uloge i statusa mitohondrijalne populacije), povezivanje svih ovih rezultata radi prepoznavanja aktivnih i ugrađenih mehanizama opravke i premoščavanja ranih poremećaja u periodu prvih deoba brazdanja.

Vremenski okvir istraživanja je smešten u posebno osetljiv period: kada se na molekularnom nivou uključuje embrionov genom, na fiziološkom nivou

embrion balansira između nastavka razvoja i zastoja u razvoju, a u kliničkoj praksi se određuje njegova dalja sudbina.

Pored toga, idući od šire ravni ka užem polju posmatranja: iako postoje istraživanja koja jasno ukazuju na bitnost mitohondrija u ranom razvoju embriona, još uvek se malo zna o molekulskim mehanizmima fragmentacije embriona, a naročito o promenama koje se tom prilikom dešavaju u samim mitohondrijama, i na strukturnom i molekulskom nivou.

Predviđena studija ima i za cilj da ispita redoks-zavisnost pojave fragmentacije, te da se na osnovu podataka do kojih se dođe omogući primena embriološki bezbednih redoks-aktivnih supstanci u gajenju embriona (bolja kontrola redoks uslova, razvoj mitohondrijalne terapije), kao unapređenog terapijskog pristupa za poboljšanje preživljavanja *in vitro* embriona.

Produbljivanje saznanja o prirodi fragmentacije kao patološkog ili regulatornog procesa na finijem biološkom nivou i upotpunjavanje višeznačnosti pojma „kvalitet embriona“, doprinelo bi unapređivanju tehnika asistirane reprodukcije, time i većoj uspešnosti njihove primene: stopama implantacije i živorođenih zdravih IVF beba.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka

U ovoj studiji korišteni su fragmentisani i nefragmentisani humani preimplantacioni embrioni dobijeni postupcima BMPO, u stadijumu D2 do D4, s tim da se kao dan nulti broji dan punkcije folikula (D-0). Korišteni su isključivo embrioni koji su izostavljeni iz postupka embriotransfera kao suvišni ili nekvalitetni te kao takvi donirani u naučno-istraživačke svrhe, po pribavljanju pisane saglasnosti informisanih pacijenata (par uključen u postupak VTO).

Sve procedure, postupci dobijanja i analize korištene u ovom istraživanju odobrene su od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije, odluka br. 674/3 od 20.05.2010. U studiji ne postoji konflikt interesa niti je ista uključena u promociju bilo kog leka, medijuma i drugih komercijalno dostupnih materijala koji se koriste u datim postupcima.

Embrioni su dobijeni postupcima VTO koji se u našoj zemlji sprovode u okviru lečenja neplodnosti, uređeni su Zakonom (Zakon o lečenju neplodnosti BMPO, Sl.glasnik RS, br. 72/2009) i izvode se po standardizovanim protokolima:

- kontrolisana ovarijalna stimulacija sprovedena je po kliničkim protokolima (tačan režim stimulacije planiran je u skladu sa pacijentovom medicinskom istorijom i pod vođenjem ordinirajućeg ginekologa; stimulacija je zaustavljena po dostizanju odgovarajućih vrednosti promera vodećih folikula i serumske koncentracije estradiola (E2);

- aspiracija oocita izvođena je transvaginalnom punkcijom folikula pod kontrolom ultrazvuka 34+1 sata po dobijanju završne injekcije humanog horionskog gonadotropina;

- kultura oocita, spermatozoida, IVF i kultura embriona izvedeni su po standardizovanim procedurama embriološke laboratorije u komercijalno dostupnim medijumima (Medicult, Origio, Denmark) i u bioinkubatorima podešenim na 37 °C i 5.5% CO₂;

- tokom kultivacije na embrionima nije vršena bilo kakva nestandardna manipulacija u smislu eksperimenta, jer je kultivacija istih zakonski dozvoljena isključivo u svrhe začeća i dobijanja deteta.

Rani embrioni donirani u naučno-istraživačke svrhe za potrebe ove disertacije su u tom smislu deo iste kohorte i kao takvi podvrgnuti biološkom zaustavljanju i daljim analizama. Studija je dizajnirana kao *prospektivna opservaciona kohorta*.

Sistem ocenjivanja je za svaku embriološku laboratoriju nezavisan, ali u skladu sa pravilima struke. U slučaju embriološke laboratorije KGA KCS embrioni su ocenjeni na takav način, uz oslanjanje na Istanbulski konsenzus kliničkih embriologa (The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting, Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011.) kao referentni okvir kao i SART kriterijume prikazane u **Tabela I**, čiji je sistem ocenjivanja u potpunosti saglasan sa kriterijumima embriološke laboratorije Odeljenja ART gde je sprovedeno posmatranje.

Svi postupci posmatranja, rukovanja ćelijama tokom gajenja i konačnog biološkog zaustavljanja sprovedeni su na grejnim pločama ugrađenim na mikroskope, unutar embriološke laboratorije.

Iz studije su izuzeti i nisu podvrgavani daljem ispitivanju: embrioni koji su bili u potpunosti nekrotičnog izgleda, u potpunosti fragmentisani embrioni (bez uočljivih blastomera, ispunjeni samo sitnim ćelijskim fragmentima), embrioni sa multinukleacijom i embrioni sa ranim zastojem (na nivou zigota ili 2C – 4C do D3). Ovakvi embrioni nisu razmatrani ni za embriotransfer.

Svaki protokol rađen je dvostruko. Iz baze podataka sa slikama toka razvoja izdvojeno je 27 embriona. Konfokalnim mikroskopom ispitano je 17 embriona. 12 embriona ispitano je transmisionim elektronskim mikroskopom, a 18 embriona kvantitativnim PCR-om. Embrioni analizirani na nivou konfokalne mikroskopije iskorišteni su za korelativnu analizu na nivou elektronske mikroskopije i za imunohistohemijsku i imunocitohemijsku analizu izoformi NOS na polutankim presecima i ATP sintaze na tankim presecima, tim redom.

Tabela I: kriterijumi za ocenjivanje brazdajućih embriona (1C – ≥8C) po SART*			
Ocena:	stepen fragmentacije:	simetričnost deoba / jednakost blastomera:	Dodatno pojašnjenje i sinonimi koji će biti korišteni u tekstu:
Izvrstan	bez ili 1- 10% fragmentacije	savršena simetrija	A klasa ; kvalitetan; savršen; dobar
Osrednji	11 - 25 % fragmentacije	umerena asimetrija	B klasa ; manje kvalitetan; umereno pogođene morfologije
Loš	> 25% fragmentacije	izražena asimetrija	C klasa ; nekvalitetan; izraženo pogođene morfologije
*SART = Society for Assisted Reproductive Technology, USA. Pojednostavljeni sistem ocenjivanja je osmišljen da bude primenjiv na sve embrione. Za brazdajuće embrione je odlučeno da se fragmentacija i simetričnost beleže po jednostavnim rasponima. Pristup SART Udruženja je razvijen kao prost i sveobuhvatan sistem koji je lako primenjiv u praksi. Ocena se odnosi na sve embrione bez obzira na dan vraćanja (transfera). Preuzeto iz: Istanbul consensus, 2011			

3.2. Svetlosna mikroskopija

Vizuelna kontrola tokom ponavljalog rukovanja gametima i embrionima koja uključuje ocenjivanje oocita i embriona, premeštanje u kulturi, *in vitro* fertilizaciju klasičnom IVF metodom, embriotransfer i krioprezervaciju, vršena je binokularnim svetlosnim stereomikroskopom – Leica MZ 12.5 (uvećanja do 100x). Pregled punktata folikula i identifikacija oocit-kumulus-kompleksa tokom aspiracije, kao i postupci bojenja i fiksacije embriona doniranih u naučno-istraživačke svrhe vršeni su pod istim mikroskopom.

Zrelost, kvalitet oocita i embriona, kao i kontrola tokom IVF metode intracitoplazmatskog injeciranja spermatozoida u oocitu (ICSI), foto i video dokumentovanje svih ćelija uključenih u postupke BMPO, vršeno je binokularnim invertnim svetlosnim mikroskopom (Leica DMI 3000B, uvećanja do 400x).

3.3. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

TEM je korištena u svrhu analize ultratankih preseka embriona, radi utvrđivanja posebnosti u rasporedu i izgledu ćelijskih organela, stanja i kontinuiteta membranskog sistema (granica između blastomera i fragmenata, sistema vakuola i cisterni, prisustva znakova autofagije, prisustva multivezikularnih telašaca, egzozoma, apoptotskih telašaca itd.). Posebna pažnja posvećena je populaciji mitohondrija ranih embriona, njihovom rasporedu unutar blastomera, prisustvu i izgledu u fragmentima, grupisanju mitohondrija u klastere i eventualnim odstupanjima od normalne morfologije.

Tokom pripreme za TEM embrioni su premeštani uobičajenim pipetama za manipulaciju ćelijama u embriološkoj laboratoriji (RI, EZ-strip, sa 130, 145, 170, i 290 μm prečnikom vrha). Embrioni su fiksirani direktnim prenošenjem iz medijuma za kulturu D2/D3 (Medicult, Origio ISM 1 Medium, Denmark) u sud sa hladnim (4 °C) 2.5% glutaraldehydom rastvorenom u 0.1 M posfatnom puferu (pH 7.2) u trajanju od 15 minuta. Postfiksacija u trajanju od 10 minuta izvedena

je u 1% osmijum tetroksidu (isti pufer). Budući da su preimplantacioni embrioni sitan i providan objekat, radi lakšeg uočavanja i rukovanja, neposredno posle postfiksacije embrioni su tri puta isprani u PBS, pa smešteni u kalupe sa otopljenim agarom. Oko embriona je skalpelom izrezivana kockica stvrdnutog agara i tako osigurani su podvrgnuti daljem postupku.

Dehidratacija je izvedena ispiranjem kroz seriju etanola rastuće koncentracije. Kalupljeni su u Aralditu (Fluka, Germany). Blokovi Araldit kalupa su sečeni na ultramikrotomu UC6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) dijamantskim nožem (Diatome AG, Switzerland). Tanki preseki su postavljeni na bakarne mrežice, bojene kombinacijom uranil acetat/olovo citrat Leica-stain sistemom (Leica Ultrastain, Wetzlar, Germany) i ispitani pod transmisionim elektronskim mikroskopom (Philips/FEI, Eindhoven, The Netherlands) opremljenim digitalnom kamerom SIS MegaView III (iTEM Olympus Soft Imaging Solutions, Germany).

Zbog velike promenljivosti fragmenata, nejednakih deoba brazdanja i presecanja ćelija u različitim ravnima kod polutankih ili TEM preseka - razlikovanje krupnijih fragmenata od blastomera, pre svega u D2 i D3, može biti otežano. Da bi se to izbeglo, urađena je sistematizacija veličina blastomera tipičnih za pojedine razvojne stupnjeve, tako da se granicom ispod koje se zaokružena citoplazma smatra fragmentom u D2 navodi 45 μm , a u D3 40 μm , dok bi vrednosti prečnika iznad ovih određivale blastomeru (Johansson, 2003.). Od značaja za razlikovanje je i relativna veličina susednih očuvanih blastomera kao i odnos veličine blastomere i promera *zona pellucidae* (koja je u okviru uobičajenih standarda za D3 embrion od $16 \pm 3 \mu\text{m}$, kako je navedeno u radu Balakier i sar., 2012.). Kako se preseki blastomere u nivou udaljenom od sredine iste mogu na mikrografiji učiniti kao fragmenti, ova teškoća premošćena je posmatranjem velikog broja preseka u nivou sredine embriona. Izostavljanjem embriona koji su rano pokazali napravilne deobe izbegnuta je teškoća u nerazlikovanju njihovih manjih blastomera od fragmenata slične veličine.

3.4. Konfokalna mikroskopija

3.4.1. Bojenje mitohondrija (Mt) embriona MitoTracker Green FM (MT-G) i MitoTracker Orange CMTM Ros (MT-orange)

Mitohondrijalna lokalizacija (raspored unutar embriona, unutar blastomera i fragmenata i u zavisnosti od stepena fragmentacije embriona), kao i mitohondrijalna funkcija je ispitivana korišćenjem Mitotracker Green, odnosno MitoTracker Orange CMTM Ros (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon). To su katjonske, fluorescentne probe koje se akumuliraju selektivno u mitohondrijama, nezavisno (MT-G), tj. zavisno (MT orange) od transmembranskog elektro-hemijskog gradijenta.

Za ova ispitivanja embrioni su inkubirani u odgovarajućem medijumu za kulturu za D2 i D3 (Medicult Origio ISM 1 Medium, Denmark) koji je sadržao MT-G, odnosno MT orange u koncentraciji od 100 nM, u trajanju od 45 minuta, u uobičajenim uslovima IVF kulture (bioinkubator, 5% CO₂, 37 °C).

Po inkubaciji sa MT-G, odnosno MT orange, embrioni su ispirani kratko tri puta, u kapima čistog ekvilibrisanog medijuma i fiksirani u 2% paraformaldehidu. Potom su uzorci montirani u Mowiol® 4-88 (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) i analizirani konfokalnim laserskim Carl Zeiss LSM510 mikroskopom (Carl Zeiss MicroImaging, Hamburg, Germany), koristeći 63x imerzioni objektiv.

Analiza podataka je vršena korištenjem LAS AF softvera (Leica Microsystems, Germany).

3.4.2. Bojenje 4,5-Diaminofluorescein diacetatom (Daf2-DA) za detekciju NO

Daf2-DA je specifična fluorescentna proba koja se u ćeliji hidrolizuje u monoacetatni oblik (DAF-A), koji se u prisustvu NO pretvara u fluorescirajući triazolni derivat DAF-2T i na taj način ciljano obeležava NO u ćelijama.

Za detekciju i lokalizaciju NO u uzorcima, embrioni su tokom 15 minuta inkubirani u odgovarajućem medijumu za kulturu za D2 i D3 (Medicult Origio ISM 1 Medium, Denmark) koji je sadržao Daf2-DA u koncentraciji od 10 μ M, u uobičajenim uslovima IVF kulture (bioinkubator, 5% CO₂, 37°C). Po inkubaciji sa Daf2-DA, embrioni su ispirani kratko tri puta, u kapima čistog ekvilibrisanog medijuma i fiksirani u 2% paraformaldehidu. Embrioni su potom montirani u Mowiol® 4-88 i analizirani konfokalnim laserskim Carl Zeiss LSM510 mikroskopom, koristeći 63x imerzioni objektiv.

Analiza podataka je vršena korišćenjem LAS AF softvera.

Za utvrđivanje zajedničkog prisustva (kolokalizacije) mitohondrija i NO unutar istog embriona, uzorci su inkubirani u odgovarajućem medijumu za kulturu za D2 i D3 (Medicult Origio ISM 1 Medium, Denmark) koji je istovremeno sadržao obe fluorescentne probe, MT orange u koncentraciji od 100 nM i Daf2-DA u koncentraciji 10 μ M tokom 15 minuta, u uobičajenim uslovima IVF kulture (bioinkubator, 5% CO₂, 37°C).

Dalji postupak pripreme uzoraka i samo posmatranje pod konfokalnim mikroskopom izvedeno je na isti način kako je opisano prethodno za obe probe.

Kvantifikacija kolokalizacije urađena je na embrionima slikanim pod istim uslovima, na višekratnim, odabranim regionima od interesa (ROI) izračunavanjem Pearson-ovog koeficijenta korelacije. Vrednost koeficijenta veća od 0.5 smatra se pouzdanim pokazateljem kolokalizacije između dve fluorofore, odnosno u ovom slučaju DAF-obeleženog NO i Mitotracker-obeležених mitohondrija. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti za svaku grupu \pm standardna greška (SE).

3.5. Imunohistohemijska detekcija proteina

Za ovu metodu korišćeni su polutanki aralditski preseci debljine 1 ili 2 μm . Preseci su prvo sprovedeni kroz proceduru uklanjanja smole (u 1% rastvoru NaOH u 100% etanolu, 30 min na 40 °C), a zatim i rehidratacije ispiranjem kroz seriju alkohola opadajuće koncentracije. Potom, u cilju otkrivanja epitopa (antigenih mesta) svi preseci su inkubirani 5 minuta u 10 mM citratnom puferu, na 600W u mikrotalasnoj pećnici i ispirani 2 puta u PBS (*engl.*, phosphate-buffered saline).

3.5.1. Streptavidin-biotin metoda imunohistohemijske detekcije

Po otkrivanju epitopa i ispiranju, izvršeno je blokiranje endogene peroksidaze u 3% rastvoru vodonik peroksida (H_2O_2) u metanolu, u trajanju od 10 minuta. Nakon blokiranja i ispiranja, preseci su inkubirani preko noći, na 4 °C u odgovarajućim primarnim antitelima (Abcam) na eNOS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), iNOS (1:100), nNOS (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Po inkubaciji i detaljnom ispiranju u PBS, izvršena je inkubacija sa univerzalnom smešom sekundarnih antitela (zapreminsko razblaženje 1:1, anti-zečji, anti-mišji i anti-kozji globulini-LSAB Univerzalni kit, Dako Scientific, Denmark), 25 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su preseci inkubirani sa konjugatom streptavidina i peroksidaze rena, takođe 25 minuta, na sobnoj temperaturi.

Detekcija mesta vezivanja u embrionu izvršena je inkubacijom preseka u 0.05% diaminobenzidinu (DAB, Sigma-Aldrich Chemie, Germany) rastvorenom u PBS, u prisustvu H_2O_2 (40 μl na 100 ml rastvora) do pojave bojene reakcije, maksimalno 10 minuta. Reakcija je prekinuta ispiranjem u česmenskoj vodi, a kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom.

Nakon dehidratacije, pločice su montirane u DPX medijumu i analizirane pod svetlosnim mikroskopom Leica DMBL.

3.6. *Imunocitohemijska detekcija proteina*

Za ovu metodu korišćeni su ultratanki aralditski preseći debljine 50-80 nm naneti na presvučene niklovane mrežice. Preseći su u cilju otkrivanja epitopa (antigenih mesta) inkubirani 5 minuta u 10 mM citratnom puferu, na 600W u mikrotalasnoj pećnici i ispirani 2 puta u PBS (*engl.*, phosphate-buffered saline).

Po otkrivanju epitopa i ispiranju dva puta u TBS izvršeno je blokiranje nespecifičnog vezivanja inkubiranjem u 5% BSA u TBS, 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, preseći su inkubirani preko noći, na 4 °C sa primarnim mišjim antitelom na b subjedinicu ATP sintaze (ab14730, koncentracija: 5 µg/ml, Abcam, Cambridge, UK).

Nakon ispiranja u TBS, preseći su inkubirani sa kozjim, anti-mišjim sekundarnim antitelima konjugovanim sa 10 nm-partikulama zlata (IgG 10nm gold), ab27241, dilucija 1:20, Abcam, Cambridge, UK), 1h na sobnoj temperature. Po inkubaciji, preseći su isprani u TBS i destilovanoj vodi, ostavljeni da se osuše na vazduhu i zatim analizirani i slikani Philips CM12 (Philips/FEL, Eindhoven, The Netherlands) opremljenim digitalnom kamerom SIS MegaView III (iTEM Olympus Soft Imaging Solutions, Germany).

3.7. *Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (RT-PCR)*

Za određivanje promena na nivou iRNK korišćen je metod RT-PCR. Relativna ekspresija je određena direktnim poređenjem dobijenih *Ct* (*engl.* cycle threshold) vrednosti, koje su normalizovane prema endogenoj kontroli. *Ct* vrednost predstavlja broj ciklusa koji je potreban da fluorescentni signal pređe prag, signal koji potiče od nespecifičnog fluorescentnog signala (*engl.* background level) i predstavlja tačku u kojoj amplifikaciona kriva ulazi u ekspanencijalnu fazu. *Ct* vrednost je obrnuto proporcionalna količini ciljne nukleinske kiseline u uzorku.

Pre određivanja nivoa ekspresije ciljnog gena urađeni su validacioni eksperimenti koji su pokazali približno jednako variranje promene *Ct* vrednosti

odgovarajućeg ciljnog gena i endogene kontrole za niz serijskih razblaženja komplementarne DNK. U našim uzorcima se kao odgovarajuća endogena kontrola pokazao gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH).

Pre RT-PCR detekcije, urađena je sinteza komplementarne DNA (cDNA), specifičnom prilagođenom metodom kojom se vrši reverzna transkripcija (RT) iz jedne ćelije po Casan i sar. (1999). U tu svrhu, korišten je komplet za cDNA sintezu RevertAid™ (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany). Smeša za RT sadržala je 1 µL 2.5 µM Oligo(dT) prajmera, 4 µL 5X reaktivnog pufera, 2 µL 10mM dNTP mešavine i 9 µL visoko-prečišćene „nuclease free“ vode. Smeša je držana na ledu i po dodavanju embriona zagrejana na 99 °C, u trajanju od 1 min da bi došlo do oslobađanja ukupne RNK i denaturacije proteina, a potom je ohlađena na 4 °C.

Pre ciklusa RT u reakcionu smešu je dodato po 20 IU inhibitora RNAze, RiboLock (1 µL) i po 40 IU reverzne transkriptaze, Molony Murine Leukaemia Virus RT (2 µL). Program RT sa ukupnom zapreminom od 20 µL izveden je u uređaju Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems® Life Technologies, CA, USA), primenjujući 60-minutni RT ciklus na 37°C, potom 5-minutni ciklus na 70°C, i okončan sa 4°C. Nakon toga urađen je RT-PCR.

U RT-PCR je korišćen iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) koji sadrži 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 0,4 mM od svakog dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), i iTaq DNK polimerazu, 50 jedinica/ml, 6 mM MgCl₂, interkalirajuću boju - SYBR Green I, 20 nM, fluorescein i stabilizatore. Sekvence korištenih prajmera (Metabion International AG, Martinsried, Germany) i uslovi reakcije prikazani su u **Tabeli II**.

RT-PCR reakcija je izvedena u 20 µl reakcione zapremine. Svaka reakciona smeša sastojala se od: 10 µl iQ™ SYBR Green Supermix 2x, po 0,25 µl svakog od prajmera finalne koncentracije 200 nM, 0,4 µl ROX (Invitrogen, USA) i *nuclease free* vode do 20 µl ukupne zapremine smeše. Po 18 µl reakcione smeše

i 2 μ l cDNK dodato je u odgovarajuće mesto na optičku ploču za RT-PCR. Uz svaki set prajmera uključena je negativna kontrola (bez cDNK), da bi verifikovali odsustvo nespecifične amplifikacije (dimere prajmera ili kontaminaciju).

Sve reakcije su izvedene na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Svaki uzorak je rađen u triplikatu, a srednja vrednost je uzeta za dalja izračunavanja. U svaku analizu bila je uključena endogena kontrola. Zbog razlika u efikasnosti amplifikacije, svaki uzorak je normalizovan na nivo ekspresije svoje endogene kontrole.

Kvantifikacija je urađena komparativnom C_t metodom. Količina ciljnog gena, normalizovanog na nivo ekspresije svoje endogene kontrole, izražena je relativno u odnosu na kalibrator i data je formulom $2^{-\Delta C_t}$, gde je $\Delta C_t = (C_t, \text{ciljnog gena} - C_t, \text{endogene kontrole})$.

Kalibrator predstavlja kontrolni uzorak (kontrola).

Tabela II. Sekvence prajmera i uslovi RT-PCR reakcija.

Gen ¹	Sekvenca prajmera	Broj ciklusa
<i>ND4</i>		
F:	5' - ACA AGC TCC ATC TGC CTA CGA CAA - 3'	40
R:	5' - TTA TGA GAA TGA CTG CGC CGG TGA - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 58 °C, 30'' at 72 °C	
<i>Ndufa 6</i>		
F:	5' - CAA GAT GGC GGG GAG CGG - 3'	40
R:	5' - GTA TAG TGA GTT TAT TTG TGC TC - 3'	
Uslovi :	15'' at 95 °C, 15'' at 59 °C, 30'' at 72 °C	
<i>COX II</i>		
F:	5' - TGC CCT TTT CCT AAC ACT CAC AA - 3'	40
R:	5' - CGC CGT AGT CGG TGT ACT CG - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 59 °C, 30'' at 72 °C	
<i>COX IV</i>		
F:	5' - AGG TGG CCC ATG TCA AGC AC - 3'	40
R:	5' - CAT GAT AAC GAG CGC GGT GA - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 59 °C, 30'' at 72 °C	
<i>Citohrom b</i>		
F:	5' - TCC TCC CGT GAG GCC AAA TAT CAT - 3'	40
R:	5' - AAA GAA TCG TGT GAG GGT GGG ACT - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 59 °C, 30'' at 72 °C	
<i>ATP sintaza</i>		
F:	5' - AGC TCA GCT CTT ACT GCG G - 3'	40
R:	5' - GGT GGT AGT CCC TCA TCA AAC T - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 56 °C, 30'' at 72 °C	
<i>Mfn1</i>		
F:	5' - GAT GCA CCG ATG AAG TAA ACG C - 3'	40
R:	5' - GCC CAG GGA AAA ACG AAA TAC AA - 3'	
Uslovi:	30'' at 95 °C, 30'' at 56 °C, 30'' at 72 °C	
<i>Drp1</i>		
F:	5' - GAA TGA CCA AGG TGC CTG TAG - 3'	40
R:	5' - AGC TAG GGT TCT GCG ACC AT - 3'	
Uslovi:	30'' at 95 °C, 30'' at 56 °C, 30'' at 72 °C	

<i>mtDNA</i>		
F:	5' - CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT - 3'	40
R:	5' - TGG CCA TGG GTA TGT TGT TAA - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 58 °C, 30'' at 72 °C	
<i>NOX4</i>		
F:	5' - CTC AGC GGA ATC AAT CAG CTG TG - 3'	40
R:	5' -AGA GGA ACA CGA CAA TCA GCC TAG - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 58 °C, 30'' at 72 °C	
<i>Cit c</i>		
F:	5' - TTG GCG GCG GAA GAG GAA GGA GT - 3'	40
R:	5' - CAA AGG CGC AGA AGT GGG GGT ATG - 3'	
Uslovi:	15'' na 95 °C, 30'' na 51 °C, 30'' na 72 °C	
<i>GAPDH</i>		
F:	5' - CCA GTG CAA AGA GCC CAA AC - 3'	40
R:	5' - GCA CGG ACA CTC ACA ATG TTC - 3'	
Uslovi:	15'' at 95 °C, 15'' at 58 °C, 30'' at 72 °C	

¹ Skraćenice korišćene u tabeli: ND4 - ND4 subjedinica kompleksa I, Ndufa6 - Ndufa6 subjedinica kompleksa I, COX II - subjedinica IV kompleksa citohrom *c* oksidaze (kompleksa II), COX IV - subjedinica IV kompleksa citohrom *c* oksidaze (kompleksa IV), Mfn1 - mitofuzin 1, Drp1 - (*engl.*, dynamin related protein1), mtDNK - mitohondrijalna DNK, NOX4 - NADPH oksidaza 4, *Cit c* - citohrom *c*, GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza.

3.8. Statistička obrada rezultata

Statistička značajnost dobijenih rezultata je testirana sa GraphPad Software 3.03. Za poređenje rezultata između grupa korišćena je ANOVA. Statistička značajnost rezultata je određivana Tukey testom. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće $p < 0.05$.

4. REZULTATI

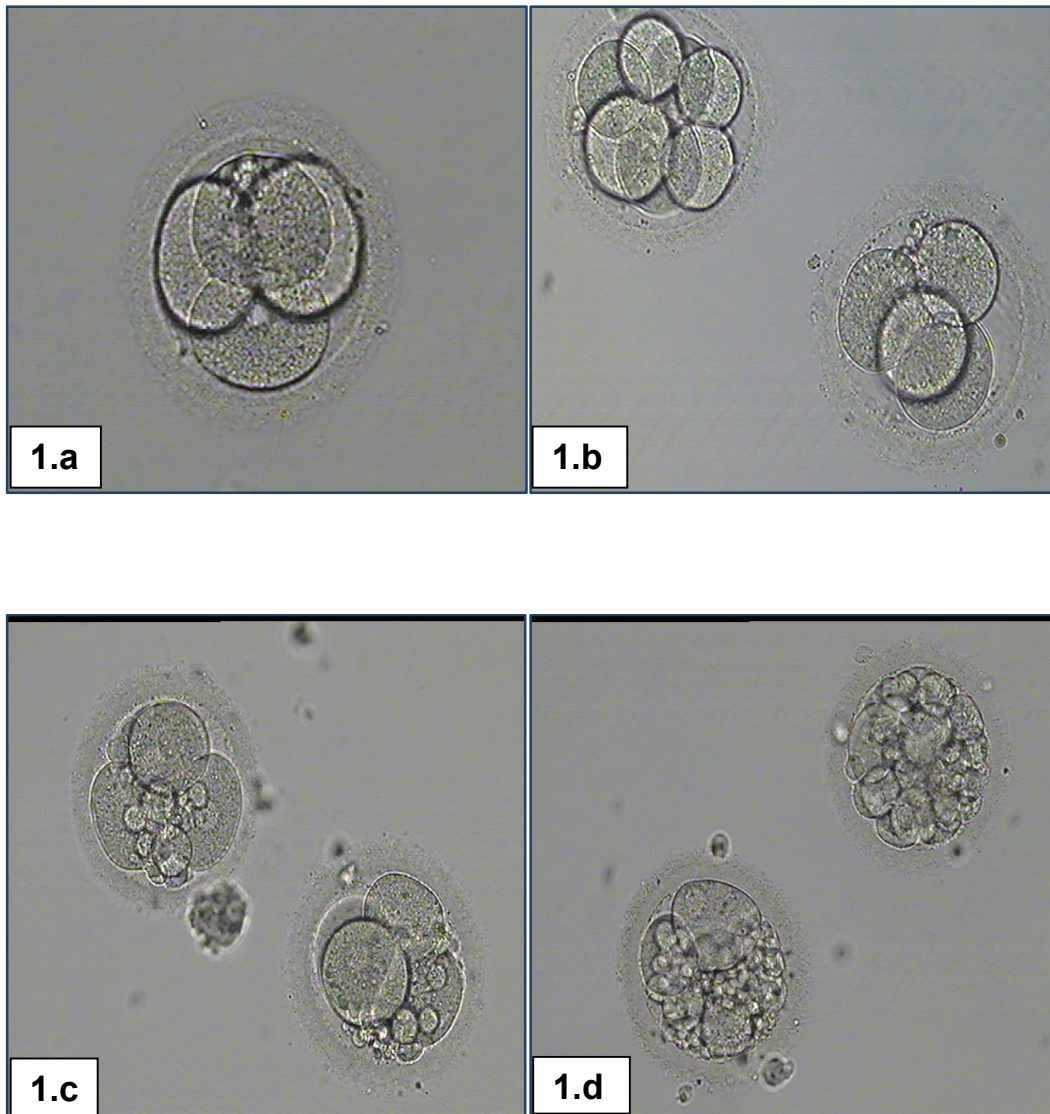
U ovoj doktorskoj disertaciji studirane su ultrastrukturne i molekulske promene tokom fragmentacije preimplantacionih humanih embriona u cilju utvrđivanja veze sa zastojem u razvoju. Analizirani su nefragmentisani i fragmentisani humani preimplantacioni embrioni na nivou svetlosne, elektronske i konfokalne mikroskopije, imunohistohemijski i imunocitohemijski su lokalizovani enzimi i proteini uključeni u ove procese i određivana je ekspresija iRNK enzima OXPHOS, ATP sintaze kao i količina mDNK. U cilju ispitivanja uloge NO, rađena je kolokalizaciona studija sa mitohondrijalnim markerom.

4.1. Rezultati posmatranja na svetlosnom mikroskopu

U skladu sa navedenim kriterijumima embriološke laboratorije svi embrioni iz IVF programa se ocenjuju po kvalitetu, prilikom posmatranja pod invertnim mikroskopom. Za ovu studiju je od značaja određivanje relativnog stepena zahvaćenosti embriona fragmentima koje je služilo kao osnov za podelu na tri grupe: embrioni su razvrstani kao morfološki savršeni (A), osrednjeg kvaliteta (B) i loši (C). Na ovom nivou posmatranja još je moguće uočiti izraženo tamne blastomere nekrotičnog izgleda, prisustvo više jedara unutar jedne blastomere, krupne vakuole, tamne ćelijske inkluzije i granulaciju unutar blastomera. Time se moć razlučivanja na nivou lupe u IVF laboratoriji završava.

Pregled tipova embriona koji su predmet studije, uključujući i podelu na klase kvaliteta, primere promena koje su od interesa za rad, kriterijumi za isključivanje, dat je na **Slikama 1-4**. **Slika 3** daje pregled nepravilnosti u razvoju koje su izuzete iz ove studije, radi postizanja ujednačenosti opservacione kohorte u pogledu predmeta posmatranja. Ovo su ekstremne nepravilnosti koje

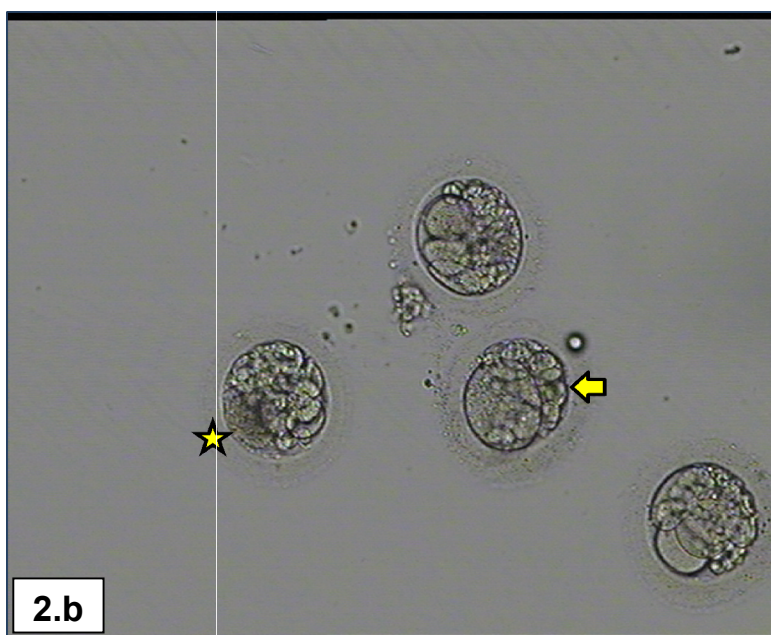
bi zbog svoje složene etiologije i višeznačnosti mogle uticati na objedinjavanje rezultata.



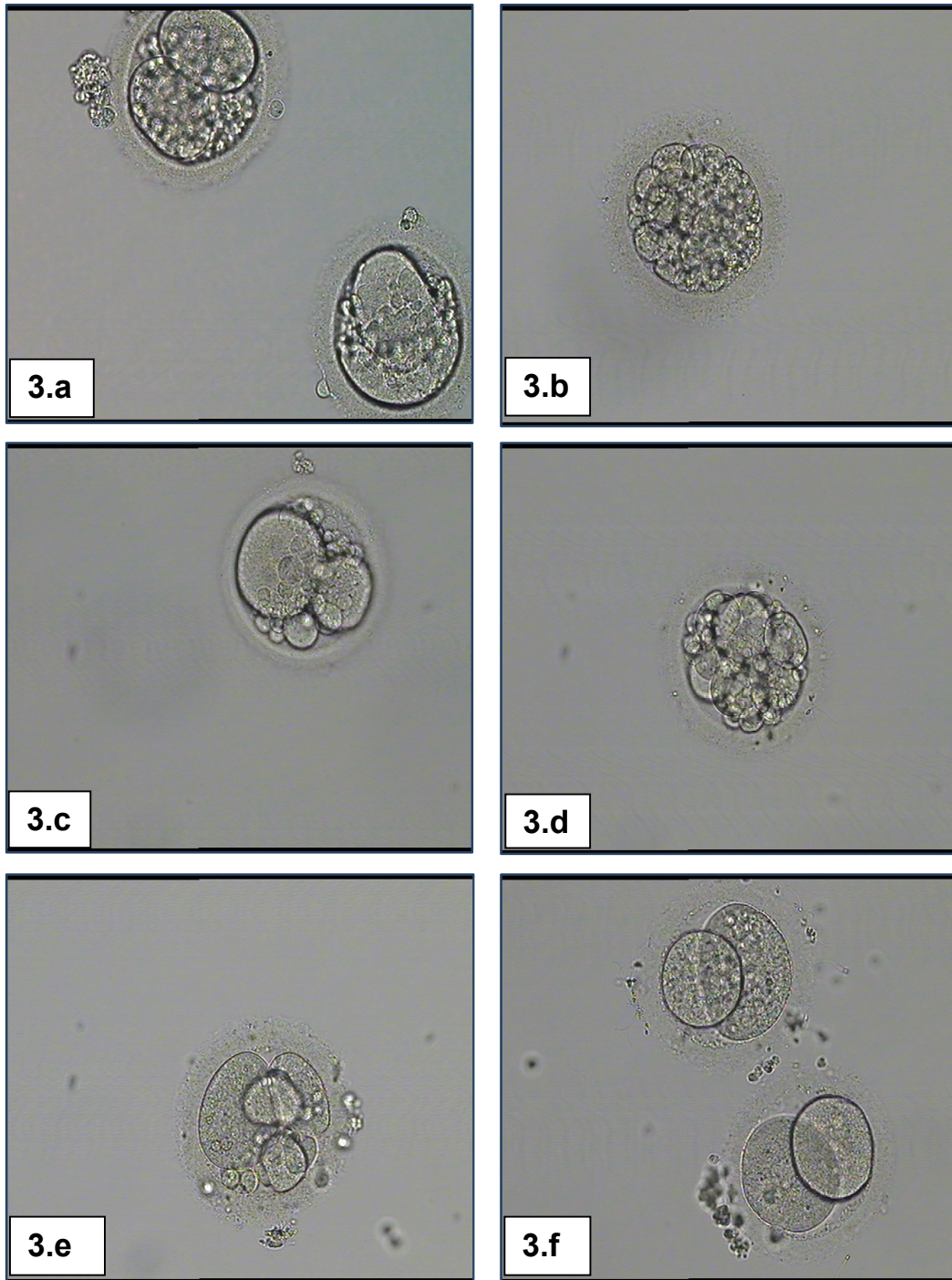
Slika 1. Humani embrioni različitog kvaliteta: **1a** - embrion A klase; D2, 4C; **1b** - embrion A klase, D3, 4C i 8C, svi bez fragmentacije; **1c** - embrioni B klase, 2 x 4C sa \approx 20% fragmentacije; **1d** - embrioni C klase, sa više od 30% fragmentacije. Uvećanje: x20 orig.



Slika 2.a. Grupa kvalitetnih IVF embriona, D3; 1 embrion u zastoju, označen zvezdicom i 2 embriona sa nepravilnim deobama, označena strelicom, ostali su A klasa. Uvećanje: x10, orig.



Slika 2.b. Grupa nekvalitetnih IVF embriona; D3; 4 embriona C klase sa izraženom fragmentacijom, zvezdicom je označen embrion sa nekrotičnom blastomerom, strelicom embrion u stupnju 2C sa potpuno fragmentisanom blastomerom. Uvećanje: x10, orig.



Slika 3. Embrioni nepogodni za transfer i isključeni iz studije. **3.a** – centralna rana fragmentacija, D2; **3.b** - potpuna fragmentacija, D3; **3.c** - rani zastoj, centralna fragmentacija, D3; **3.d** - kasni zastoj između D3 i D4, izostanak kompakcije i blastulacije u D5; **3.e** - nepravilna podela sa asimetrijom embriona, D3; **3.f** - kasna prva deoba, tek u D2, zastoj, D4. Uvećanje: x20, orig.

4.2. Rezultati posmatranja ultrastrukture embriona na TEM

Elektron-mikrografije ranih embriona koje su odvojene za prikaz u okviru ove studije prikazuju pojedinosti na nivou ultrastrukture: stanje i raspored organela u ćelijama kao i detalje iz prostora omeđenog blastomerama koji su potpuno nepristupačni pogledu na nivou svetlosne mikroskopije.

Rezultati TEM analize su bili prvi u okviru sprovedenih ispitivanja i od značaja za određivanje narednih koraka u ispitivanju fragmentacije i traženja veze sa razvojnim kapacitetom embriona. Poseban naglasak je stavljen na mitohondrijalnu populaciju ranog embriona i uočavanje :

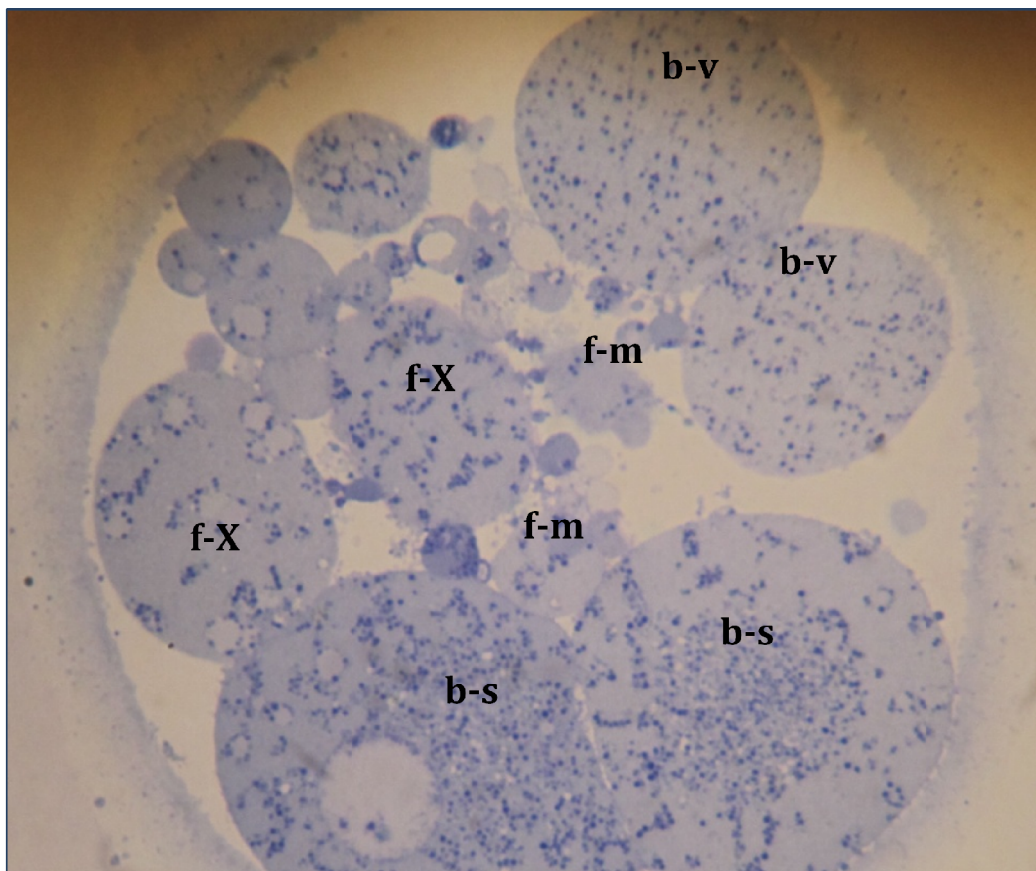
- pravilnosti u rasporedu unutar blastomera
- prisustva mitohondrija u u fragmentima
- pojedinosti u sub-plazmalemalnim domenima, međublastomernom prostoru, auto-fagozomima...
- opšteg izgleda, izmenjenosti građe i unutrašnjeg izgleda mitohondrija u poređenju sa tipičnom funkcijom mitohondrijom
- odnosa sa sistemom vakuola i endoplazminog retikuluma

Sveukupnom analizom dobijenih elektron-mikrografija ranih embriona utvrđeno je sledeće:

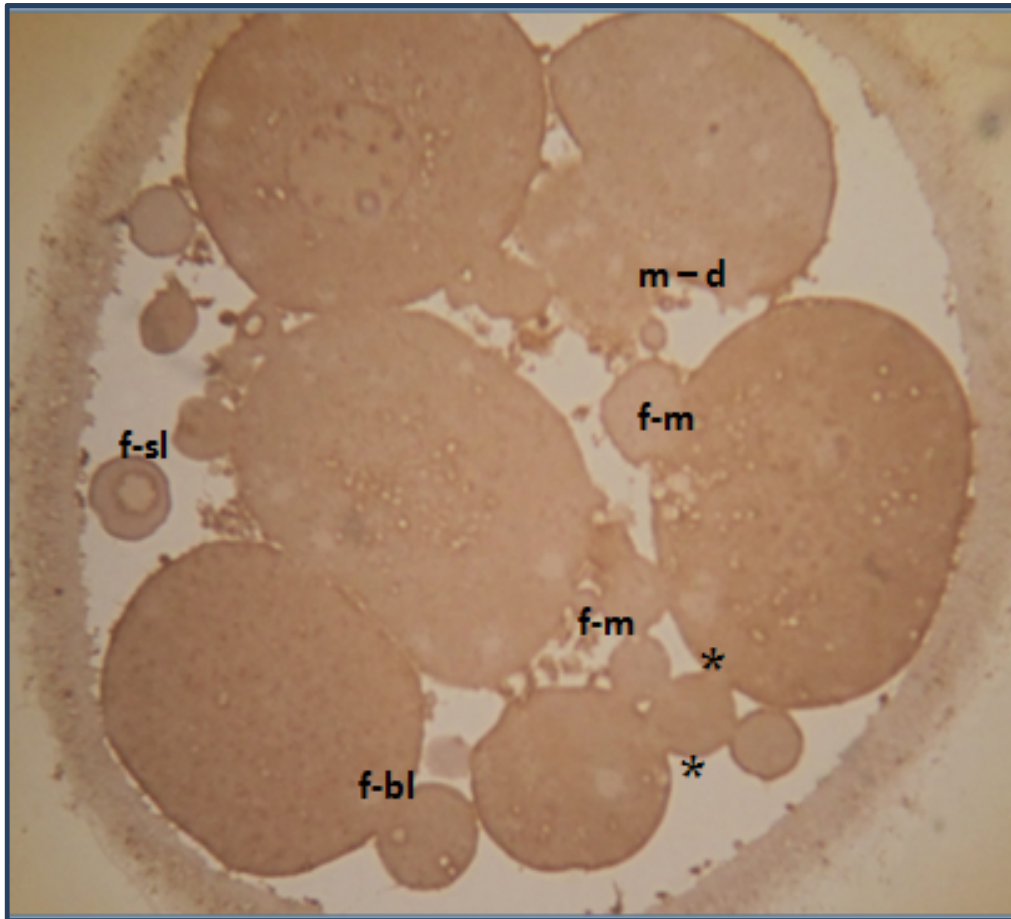
4.2.1 Opšta zapažanja u vezi blastomera i fragmenata

- većina embriona pokazivala je fragmentaciju u većoj ili manjoj meri (**Slika 4**)
- embrioni ocenjeni kao A, bez vidne fragmentacije uočene svetlosnim stereomikroskopom *in vivo*, pokazivali su prisustvo skrivenih fragmenata iako u manjoj meri. Oni su uočeni već na polutankim presecima, na površini embriona kao i između blastomera, tj.u prostoru koji je teži za posmatranje pod standardnom lupom (**Slika 4**)

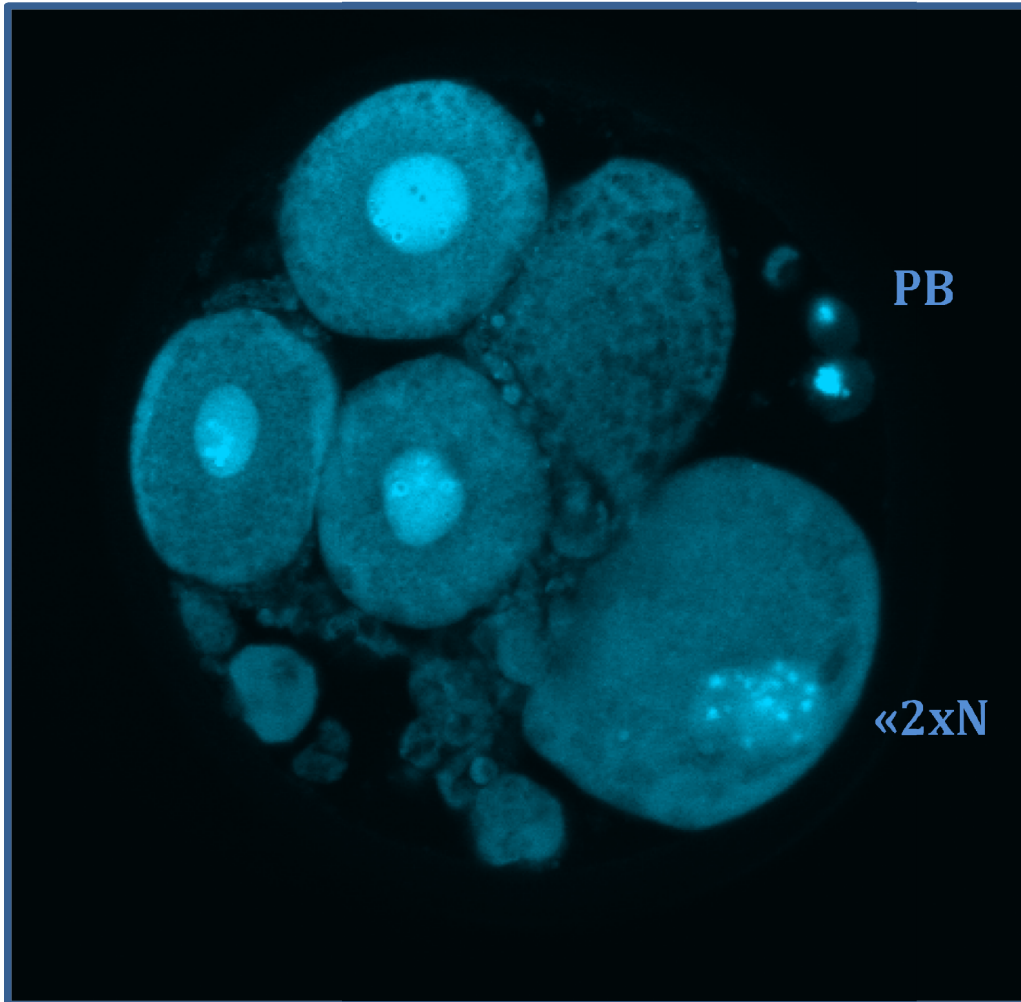
- većina fragmenata je ograničena membranom koja je po pravilu očuvana, ali su oštećenja na nivou membrana uočena na blastomerama i fragmentima tamnijeg, amorfnijeg izgleda gde su postojali prekidi (**Slika 4.b i 5.c**)
- veličina fragmenata je promenljiva, ali manja od promera blastomera karakterističnih za dati stupanj razvoja (**Slika 4.a**).
- postoje fragmenti koji su u intimnoj vezi sa blastomerom na koju su pripojeni, kao i oni koji su odvojeni i stoje u međublastomernom prostoru ili tik uz zonu (**Slike 4.a i 4.b**).



Slika 4.a. Fragmentisani embrioni, D3, 6-8C, polutanki presek; skriveni manji fragmenti (fr-m) i blastomere presečene u više ravni (po sredini: b-s, pri vrhu: b-v), fragment ili blastomera (f -x). Uvećanje: x100, orig.



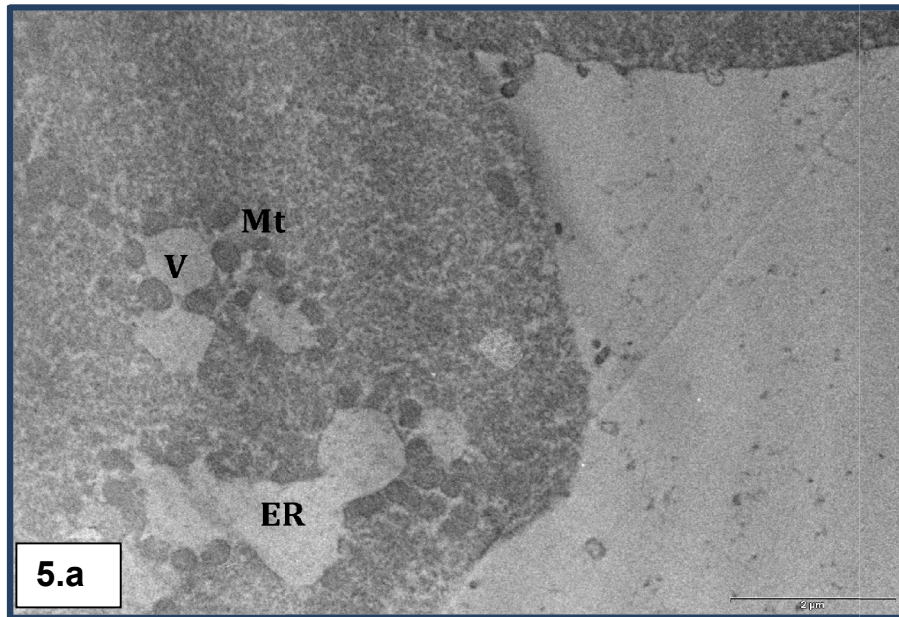
Slika 4.b. Kvalitetan embrion sa manjim fragmentima: skrivenim (f - m), priljubljenim uz blastomeru (f - bl) ili slobodnim uz ZP (f - sl). Oštećenja membrane (m - d) i kontinuitet citoplazme između više fragmenata i blastomere. Uvećanje: x100, orig.



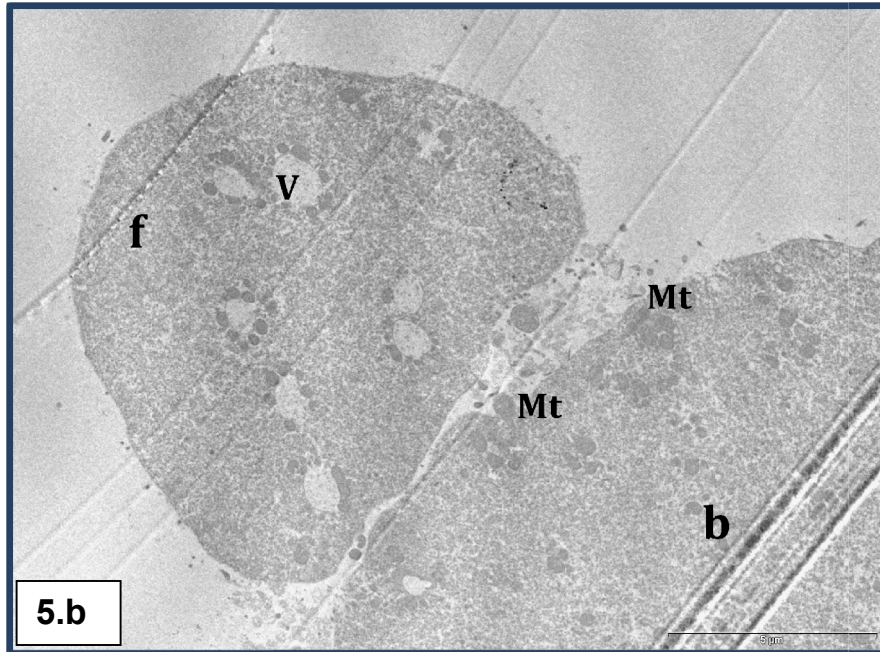
Slika 4.c. Embriion dobre morfologije, sa umerenom fragmentacijom, koji se izostavlja iz VTO postupka zbog uočene multinukleacije (2xN). Vidljive su polocite pripojene na ZP (PB); Bojenje propidijum jodidom za potrebe unutrašnje kontrole kvaliteta, konfokalni presek. Uvećanje x100, orig.

4.2.2 *Prisustvo proširenih cisterni/vakuola unutar fragmenata*

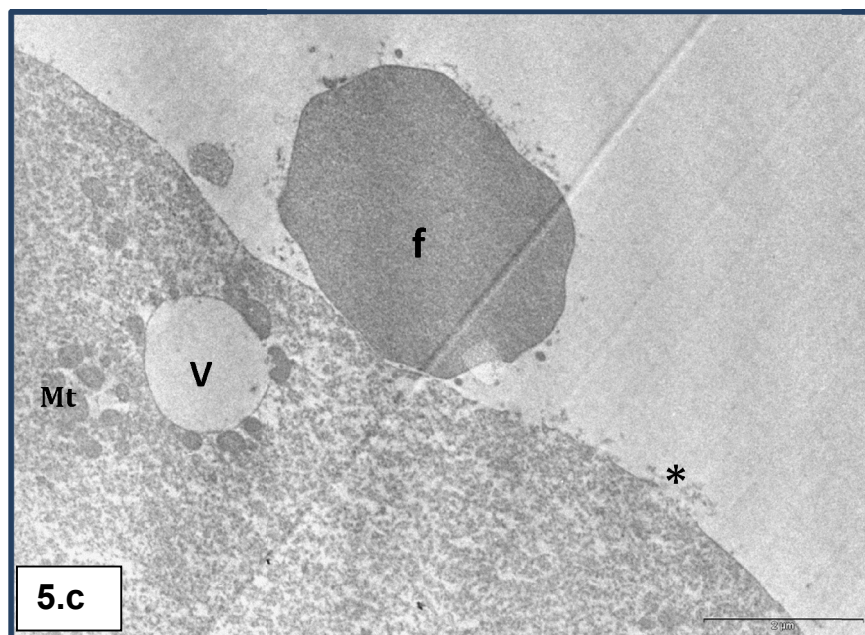
Najosobniji detalj uočen u većini velikih fragmenata su krupne vakuole ili cisterne proširenog izgleda koje su ispunjene homogenim svetlijim sadržajem i po svom izgledu odgovaraju izmenjenom endoplazminom retikulumu (cisterne ER), oko kojih su ukotvljene brojne mitohondrije izmenjenog izgleda (**Slika 5, Slika 6**).



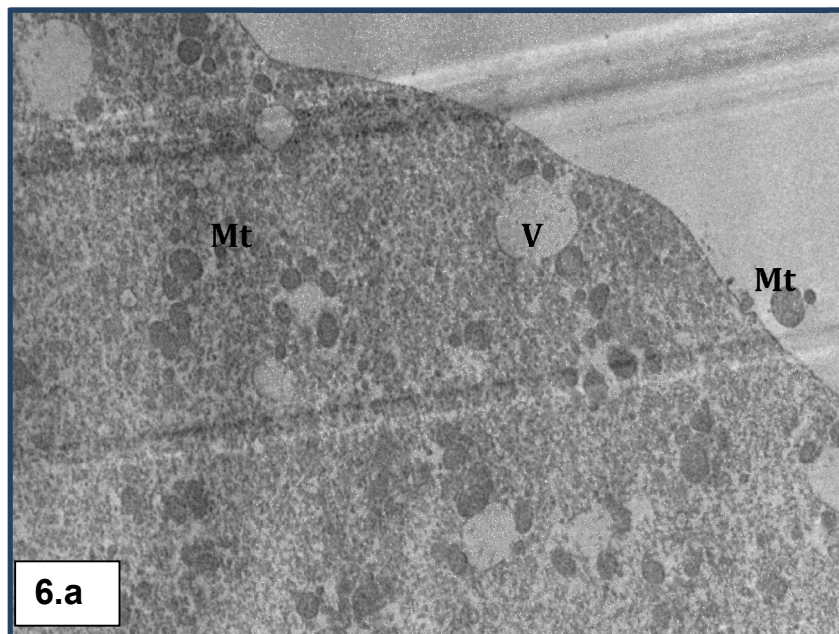
Slika 5.a. Blastomera sa izmenjenim i proširenim endoplazminim retikulumom (ER). Veća proširenja se mogu uočiti i na nivou svetlosnog mikroskopa i označavaju se kao vakuole (V). Zapaža se da je ER u klasteru sa mitohondrijama (Mt) koje se kao venac pružaju oko vakuola; Uvećanje x8800, orig.



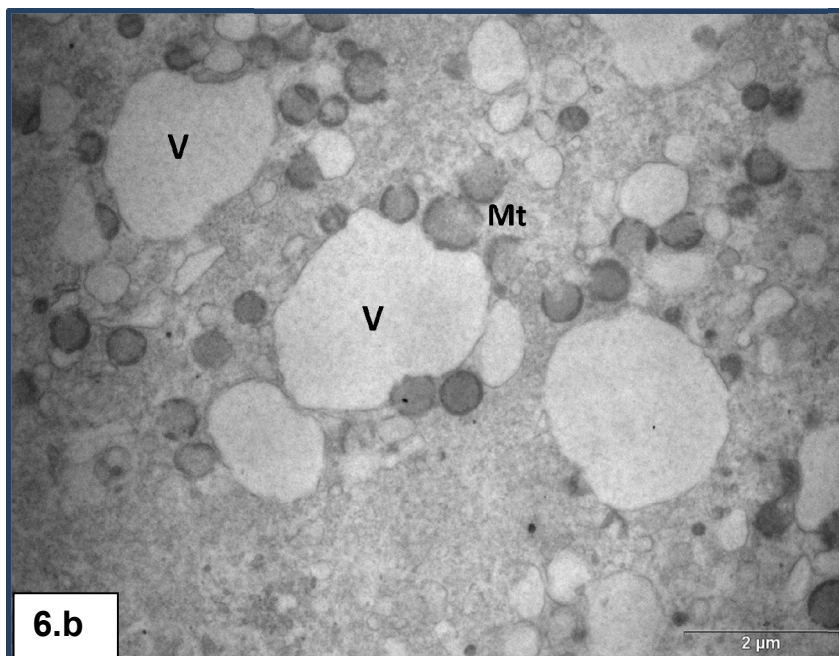
Slika 5.b. Blastomera (b) i fragment (f) sa vakuolama – proširenim ER (V); grupisanje mitohondrija (Mt) submembranski, na periferiji blastomere. Uvećanje x4400, orig.



Slika 5.c. Blastomera sa krupnom vakuolom (V) okruženom mitohondrijama i klaster mitohondrija (Mt). Uočljiv je diskontinuitet membrane (*) i tamni fragment (f) bez vidljivih organela. Uvećanje x8800, orig.



Slika 6.a. Očuvana blastomera sa sitnijim vakuolama (V) i mitohondrijama u klasterima (Mt, levo) i izvan blastomere (Mt, desno). Uvećanje x8800, orig.



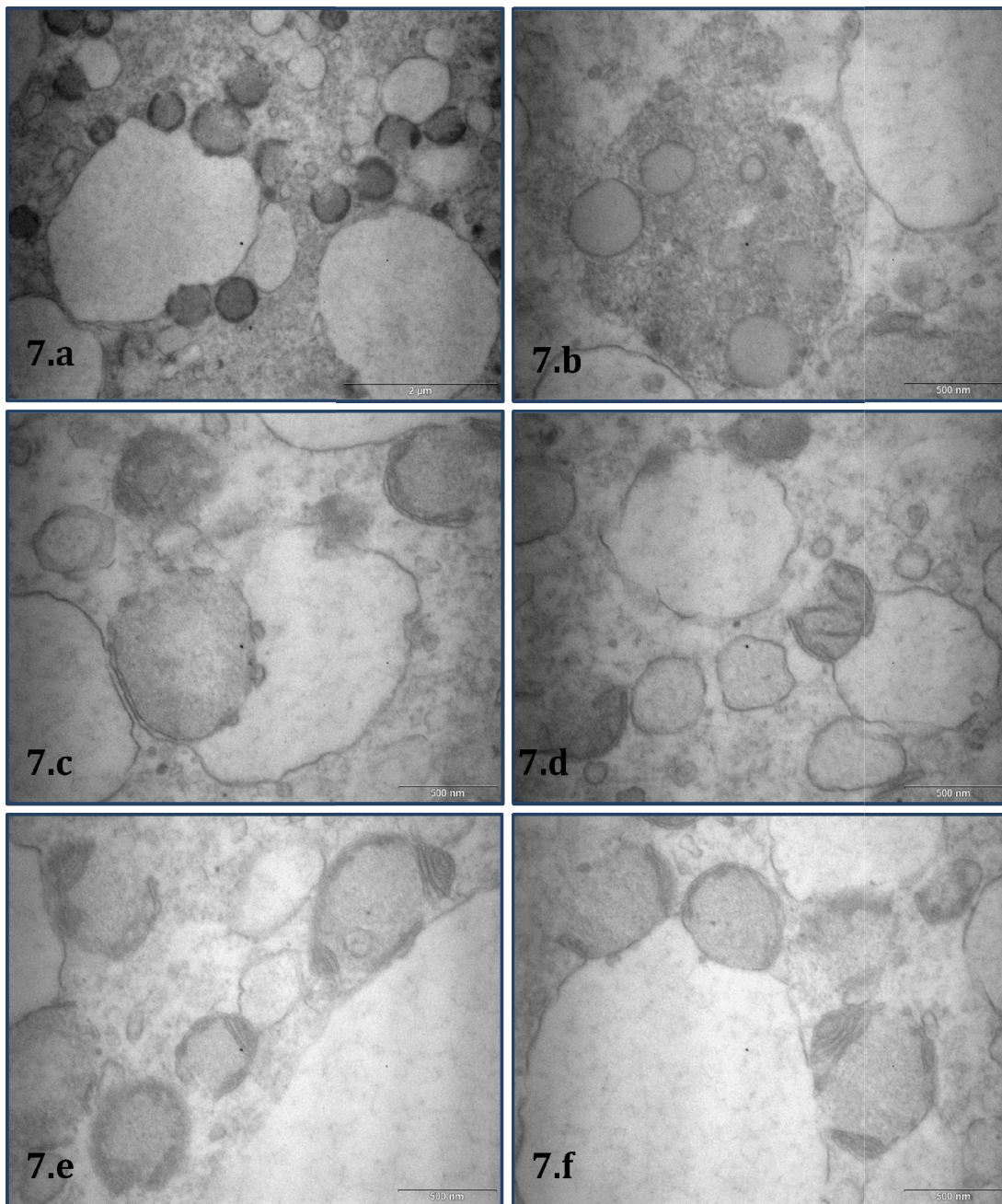
Slika 6.b. Blastomera embriona sa izraženom fragmentacijom; proširene cisterne ER u formi vakuole (V) i uvećane mitohondrije (Mt). Uvećanje x8800, orig.

4.2.3 Prisustvo mitohondrija izmenjenog izgleda unutar fragmenata i na obodima blastomera

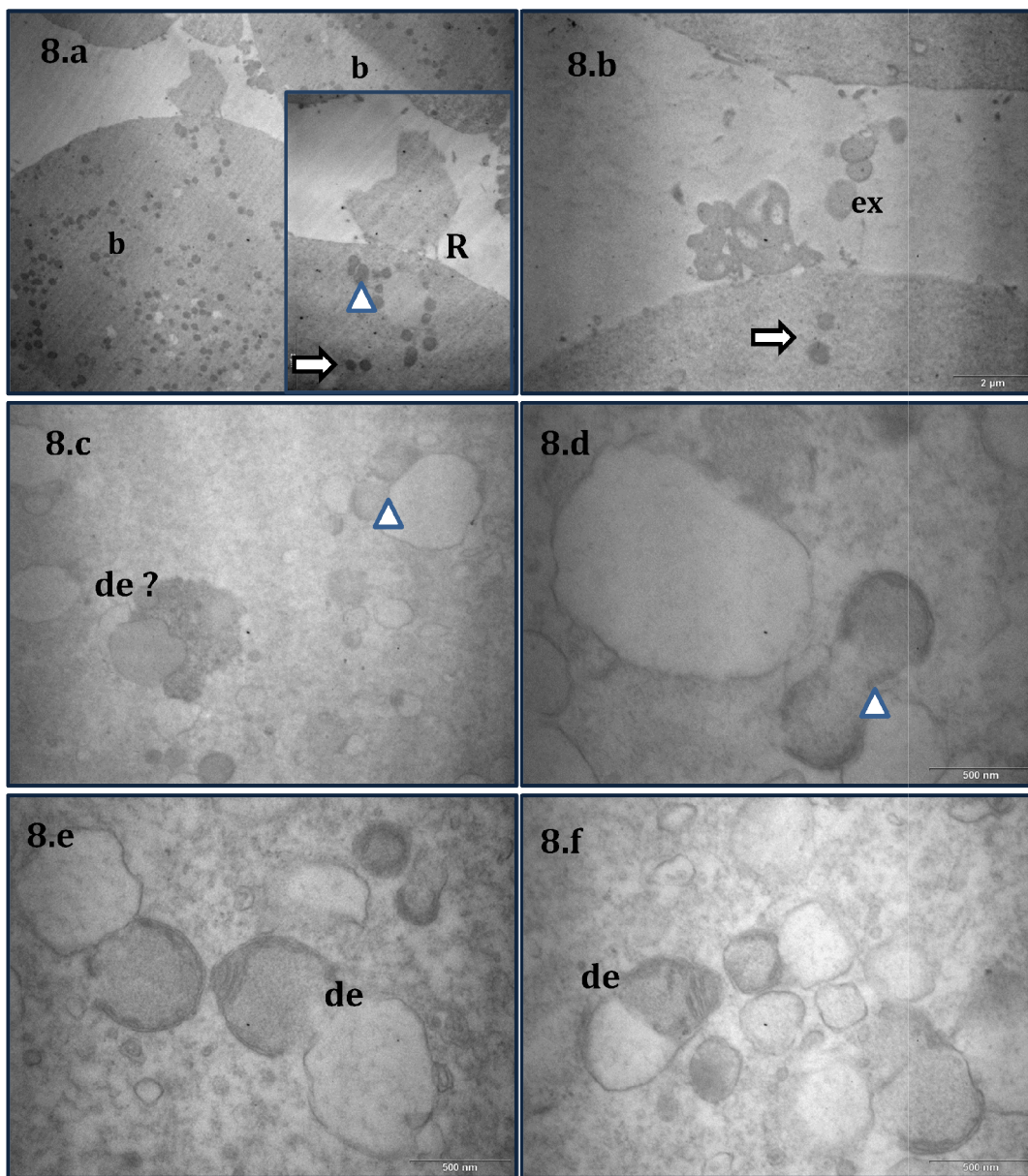
- fragmenti sa krupnim vakuolama ili cisternama ER okruženi su brojnim mitohondrijama izmenjenog izgleda (**Slika 7**). Tipična mitohondrija u ovim presecima je okrugla, nabubrela, sa izuzetno malim brojem kristi koje su skraćene i nejasnih granica. **Slike 7.c - 7.f** detaljnije pokazuju fizički odnos ovih mitohondrija sa vakuolom kao i pojavu dezintegracije spoljne membrane mitohondrije i mogućeg stapanja sa prostorom vakuole (dodatno na **Slici 8.e i Slici 8.f**).
- fisija mitohondrija uočena je i na obodima blastomera u neposrednoj blizini atretičnih fragmenata (**Slika 8.a**), kao i na pojedinim mestima unutar blastomera (**Slika 8.d**).
- uočeni su i prizori dezintegracije mitohondrija koji odgovaraju autofagnom razlaganju (mitofagija, **Slika 7.b i Slika 8.c**), prisustvo mitohondrija u međublastomernom prostoru (**Slike 6.a, 8.b i 11.a**) kao i formiranje mitoptotskih tela (**Slika 8.a - umetak i 8.b**).

4.2.4. Neposredna veza mitohondrija izmenjenog izgleda sa jedrom

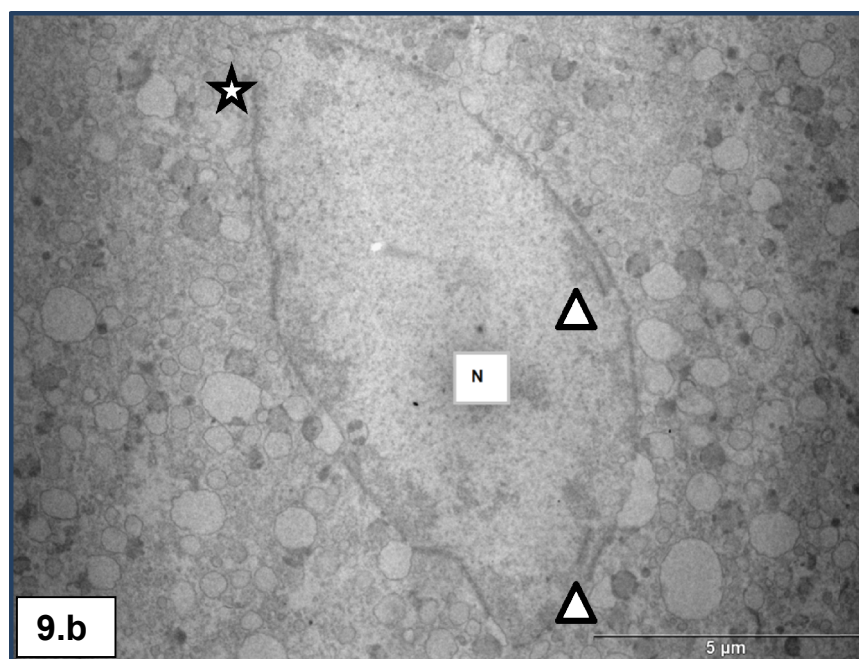
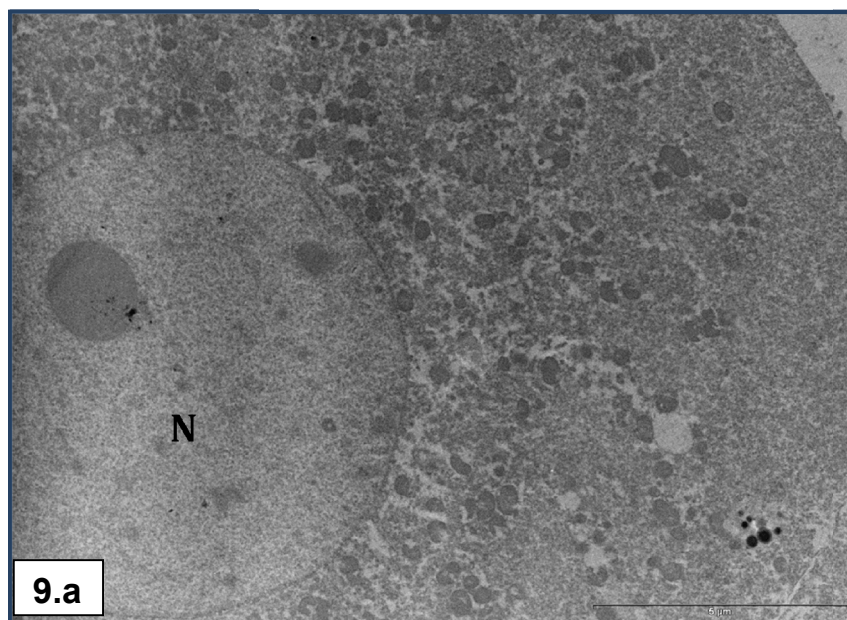
- jedra su na dostupnim presecima uočena izuzetno retko.
- jedarni materijal nije uočen u fragmentima uz ogradu da je trajanje interfaze u toku ranog brazdanja dosta skraćeno i time teže uočljivo. Neke od osobnosti uočene na jedrima ranih embriona prikazane su na **Slici 9 i Slici 10**. Neki od detalja zapaženih unutar jedra nisu rastumačeni citološki (**Slika 10.a**).
- na nekoliko mikrografija uočena je bliska veza između jedra i mitohondrija izmenjenog izgleda (**Slika 9.b, Slika 10.a i Slika 10.b**) kao i strukture koje podsećaju na mitohondrije stopljene sa unutrašnjim sadržajem jedra (**Slika 9.b, označeno zvezdicom**).



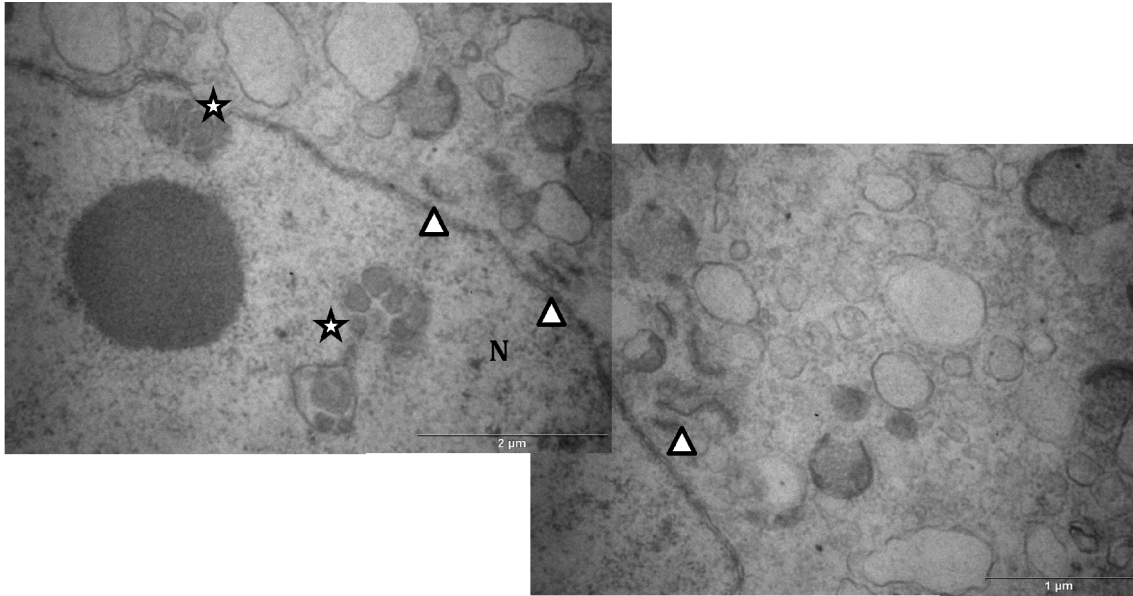
Slika 7. Burne promene izgleda i rasporeda mitohondrija fragmentisanih embriona: izmenjene spoljašnja i unutrašnja membrana, gubitak kristi, izmenjeni izgled krista, bubrenje i stapanje Mt sa vakuolama ER. Mini-autofagija mitohondrija od strane vakuole (7c) i formiranje autofagne vakuole (7b). (Uvećanje: 7.a x15000, orig; 7.b -7.f x40000, orig., serija sa drugim embrionom).



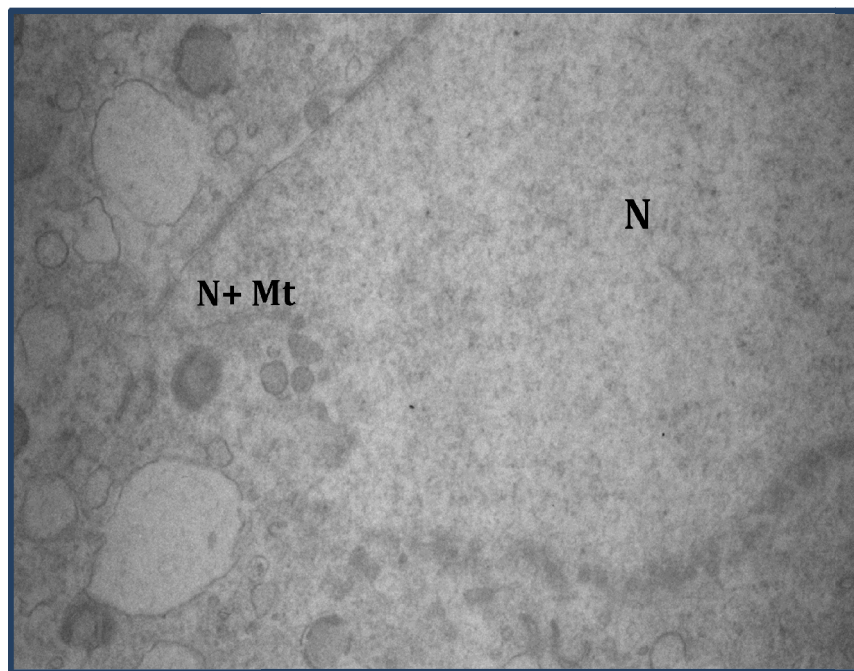
Slika 8. Dinamika mitohondrijalne populacije: procesi fisije (Δ , 8.a, 8.c., 8.d), dezintegracije u kontaktu s minijaturnim kanalima ER (de) i dezintegracije tipa mitofagije (de?); Mitoptoza sa formiranjem mitoptotskih tela (strelice); Mestimično nalaženje mitohondrija van blastomera (ex); Mogući scenario resorpcije fragmenta sa očuvanim mitohondrijama oko cisterne ER (R); Uvećanje: x2650, orig. i umetak x8800; 8.b x7100, 8.c x15000; 8.d – 8.f x40000.



Slika 9. Presek blastomera u nivou jedra (N). **9.a.** Tipično jedro očuvane blastomere, okruglastog oblika, euhromatsko, sa dobro izraženim jedarcetom. **9.b.** Izduženo jedro izmenjene blastomere, neuobičajen diskontinuitet jedrovog ovoja sa zahvaćenim strukturama koje podsećaju na mitohondrije (zvezdice); Prisustvo lamelarnih struktura uz jedrov ovoj (Δ); Uvećanje: x5600, orig.



Slika 10.a. Prisustvo lamelarnih struktura uz jedrov ovoj (Δ); neuobičajen diskontinuitet jedrovog ovoja sa zahvaćenim strukturama koje podsećaju na mitohondrije (zvezdice); Uvećanje: x25000, orig.



Slika 10.b. Jedro obuhvata grupu mitohondrija (N+Mt); uočavaju se i blisko približene vakuole endoplazminog retikuluma. Uvećanje: x15000, orig.

4.2.5. Analiza sadržaja međublastomernog prostora - više od detritusa, manje od jasne uloge

U prostoru koji je omeđen blastomerama, ili fragmentima uočava se međublastomerni materijal promenljivog izgleda. Čak i embrioni A klase sa spolja neuočljivim fragmentima, na polutankim presecima pokazali su prisutnost sićušnih fragmenata i debrisa. Ovaj prostor je detaljno ispitan na većim uvećanjima, pomoću TEM mikroskopije.

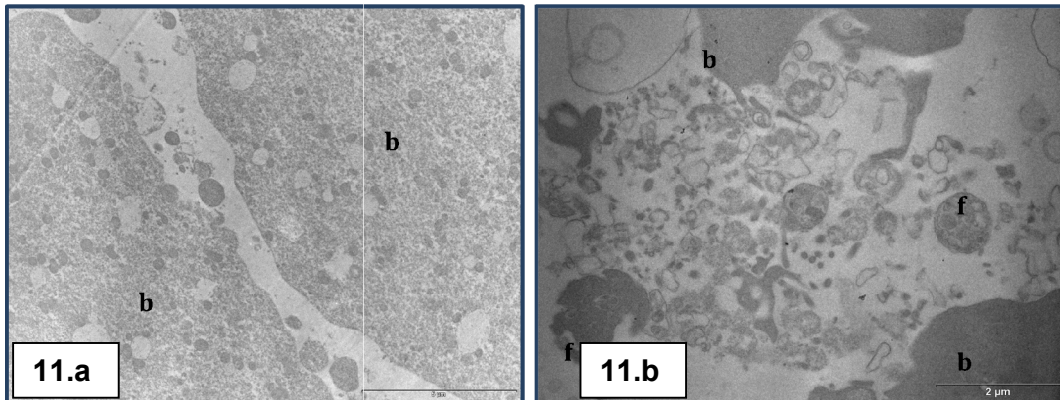
- Na polutankim presecima (**Slika 4**) uočljive su, za D3, tipične okrugle blastomere, fragmenti različite veličine i promenljiva količina međublastomernog materijala koji izgledom ne odgovara fragmentima.
- U središnjem delu embriona, u prostoru koji je omeđen blastomerama postoji promenljiva i amorfna količina materijala koji podseća na vanćelijski debris. Količina ovog materijala bila je znatno veća u embrionima lošeg kvaliteta (**Slika 11.b**).
- Na većim TEM uvećanjima u ovom materijalu uočljiva su telašca promenljivog izgleda, obavijena višeslojnom membranom i sitne vezikule unutar njih. Po izgledu ove strukture odgovaraju multivezikularnim telima (MVBs) i egzozomima. Prikazane su i opisane na **Slici 11.c** i **11.d**.
- Ispitivanjem embriona koji je u potpunosti pokazao nekrotičan izgled i gubitak ćelijskog kontinuiteta utvrđeno je da su jedine preostale očuvane membrane bile membrane MVBs koje su okruživale vezikule tipa egzozoma u nastajanju (**Slika 11.b, 11.c** i **11.d**).

4.2.6 Pojava multivezikularnih telašaca i otkriće egzozoma kod ranih embriona

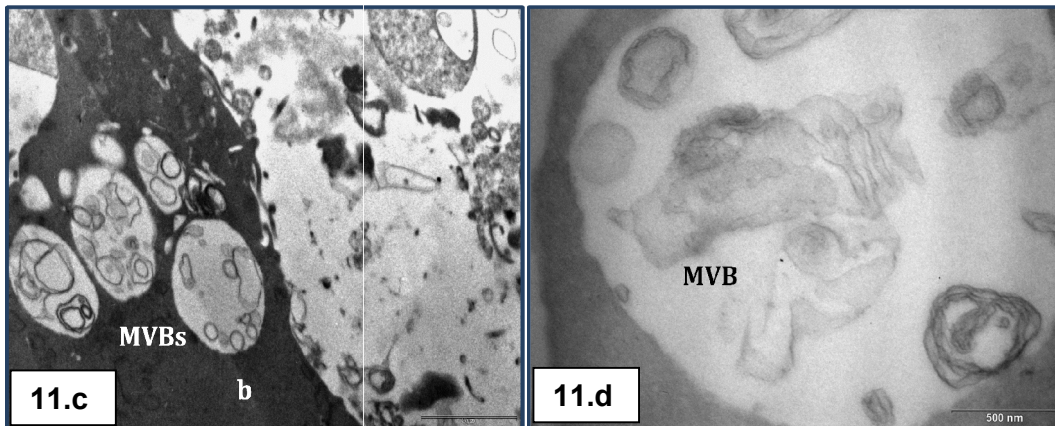
Prostoru koji je omeđen blastomerama, ili fragmentima je detaljno ispitan na većim uvećanjima, pomoću TEM mikroskopije.

Uvećenja od 2600 do 40000 pokazala su prisustvo multivezikularnih tela (**Slika 11.**, oznaka MVB). Unutar MVB uočena su telašca tipa egzozoma, čija je srednja veličina promera $160\text{nm} \pm 0.5 \text{ nm}$ u proseku, tačno odgovarala do sada

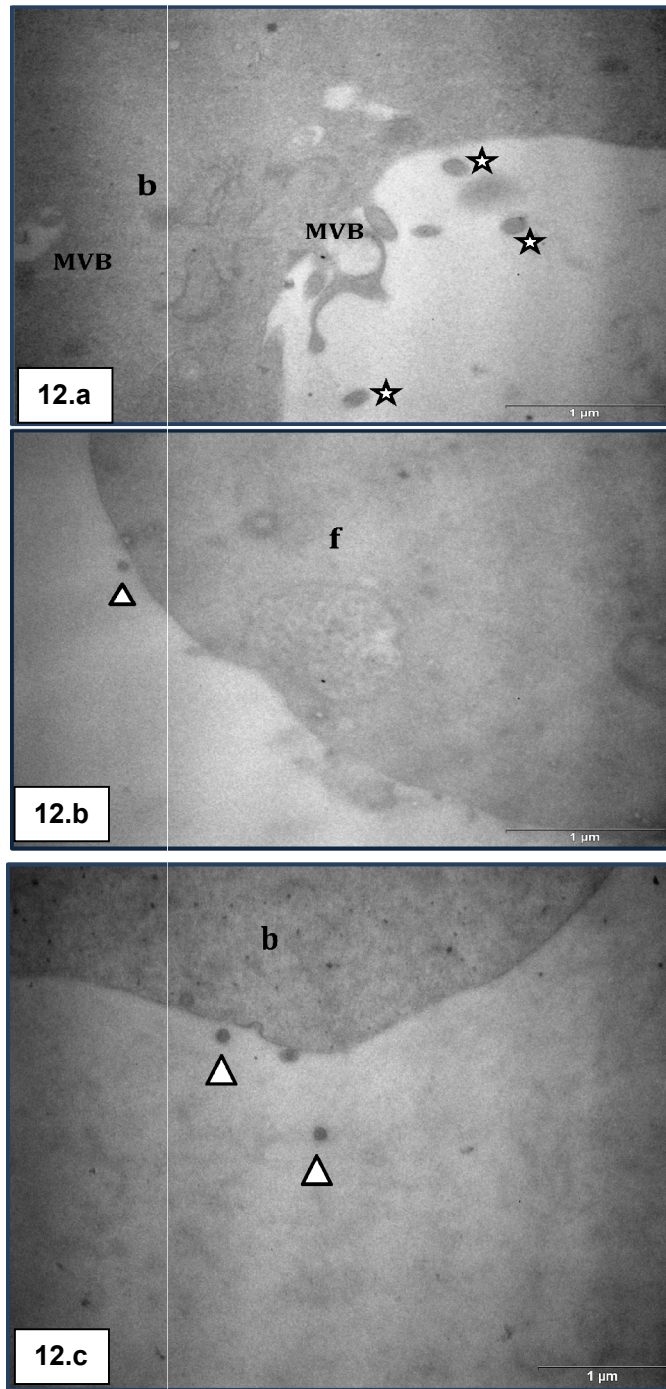
objavljenim opisima egzozoma. Uočena su i nešto veća telašca, izgleda nabubrelog egzozoma, jednako uspostavljena membranom i ispunjena sadržajem promenljivog kontrasta (**Slika 11.b** i **11.d**). Na istim presecima uočeni su i slobodni egzozomi među blastomerama, u neposrednoj blizini ćelijskih membrana (**Slika 12.a**). Dodatno, uočeni su i u trenucima fuzije sa membranama blastomera (**Slika 12.c**) i fragmenata (**12.b**).



Slika 11. Dve blastomere (b) očuvanog embriona (**11.a**) sa promenljivim međucelijskim materijalom. Za razliku od njih, međublastomerni debris atretičnog embriona (**11.b**) ispunjen je membranoznim strukturama. Uvećanje: 11.a x2650; 11.b x11500, orig.



Slika 11. Tamna blastomera (b), sa više multivezikularnih tela (MVBs) prisutnih u submembranskom delu citoplazme (**11.c**). Na većem uvećanju jasno se uočavaju egzozomalne vezikule i membranozne strukture nepoznatog porekla (**11.d**). Uvećanje: 11.a.x8800; 11.b x40000, orig.



Slika 12. Slobodni egzozomi u međublastomernom prostoru atretičnog embriona (**12.a**, zvezdica) i ostatak multivezikularnog tela (MVB); moguće preuzimanje egzozoma od strane fragmenta (f) (**12.b**, Δ), i mogući niz endocitotskog preuzimanja egzozoma (**12.c**, Δ) gde se vide ukupno 3 egzozoma van blastomere i jedan internalizovan od strane blastomere (b) očuvanog embriona. Uvećanje: x19500, orig.

Naglašeno veće prisustvo egzozoma bilo je u fragmentisanim embrionima. Kod embriona koji su najvećim delom bili fragmentisani središnji prostor embriona bio je ispunjen obilim debrisom, apoptotskim telima kao i značajnom količinom multivezikularnih tela i egzozoma. Količina, izgled i slojevitost ovih membranoznih struktura varirali su u fragmentisanim embrionima, dok su egzozomi pokazivali relativnu uniformnost.

I blastomere i fragmenti su pokazivali sposobnost fuzije sa egzozomima, uz ogradu da na ovom nivou nije potpuno izvesno da li je u pitanju uzimanje ili oslobađanje pojedinačnog egzozoma.

U predelu grupisanja MVB uz membranu su uočene i proširene cisterne ER kao i mitohondrije.

4.3. Rezultati posmatranja celih embriona na konfokalnom mikroskopu – raspored i međuođnos mitohondrija i NO

4.3.1. Prisustvo i raspored mitohondrija unutar embriona različitog kvaliteta

Raspored mitohondrija nije ujednačen među blastomerama embriona, kao i unutar jedne blastomere. Embrioni pokazuju jaku obojenost Mitotrackerom, bez obzira na postojeće razlike u rasporedu.

Slika 13.a pokazuje kako se i u naprednom embrionu A klase raspored mitohondrija, kao i kolokalizacija NO i mitohondrija razlikuju. Kod D3 embriona uočljivo je povlačenje fluorescencije mitohondrija sa oboda blastomera i postojanje agregacija mitohondrija, koje nisu uvek kolokalizovane sa "vrelim" NO mestima.

Mitohondrije su prisutne u fragmentima embriona gde pokazuju jaku obojenost na pojedinim nestima unutar fragmenata, ukazujući na moguće grupisanje oko prosvetljenih vakuola. Sličan način grupisanja može se uočiti i u pojedinim delovima blastomera. Neretko na jednoj strani blastomere postoje jača obojenja u neposrednoj blizini membrane ćelije.

Embrioni zahvaćeni fragmentacijom pokazuju sve neujednačeniji raspored mitohondrija, pogotovu u embriona veoma zahvaćenih fragmentacijom. **Slika 13.b** daje pregled razlika koje postoje u 4C embrionima sve tri klase.

4.3.2. Prisustvo i lokalizacija NO unutar embriona različitog kvaliteta

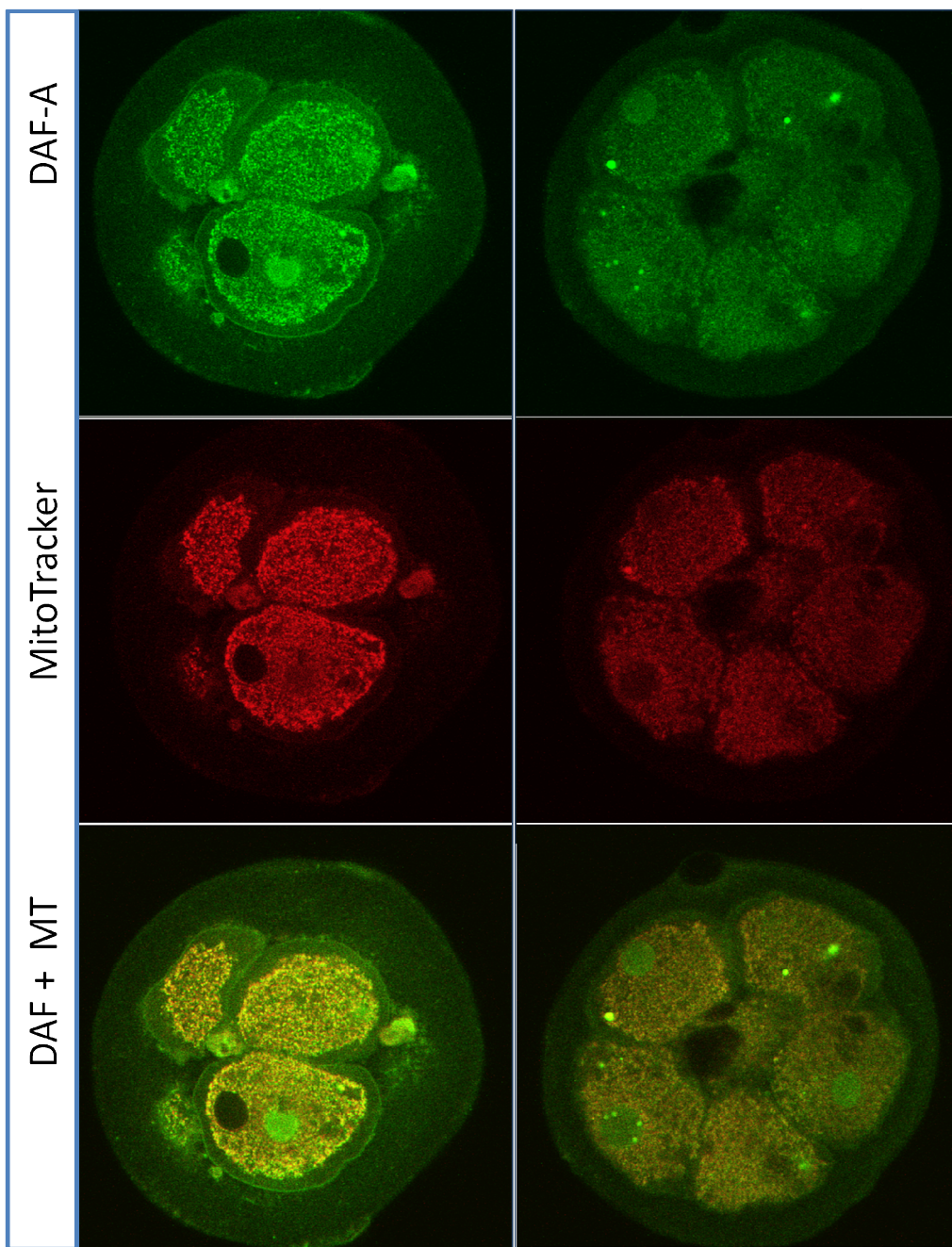
NO oksid nije ujednačeno prisutan u posmatranim embrionima. Embrioni A klase pokazuju relativno jednaku obojenost blastomera Daf2-DA probom, uz ogradu da unutar svih embriona pojedina mesta pokazuju izuzetno visok intenzitet boje, a smeštena su često i izvan blastomera (**Slika 13.b**, embrioni B i C klase) kao i neposredno uz jedro ("vrole tačke"), što se vidi na **Slici 13.a**, konfokalni presek na desnoj strani.

Embrioni zahvaćeni fragmentacijom pokazuju sve neujednačeniji raspored NO, pogotovu u slučaju veoma pogođenih embriona. **Slika 13.b** daje pregled razlika koje postoje u 4C embrionima sve tri klase.

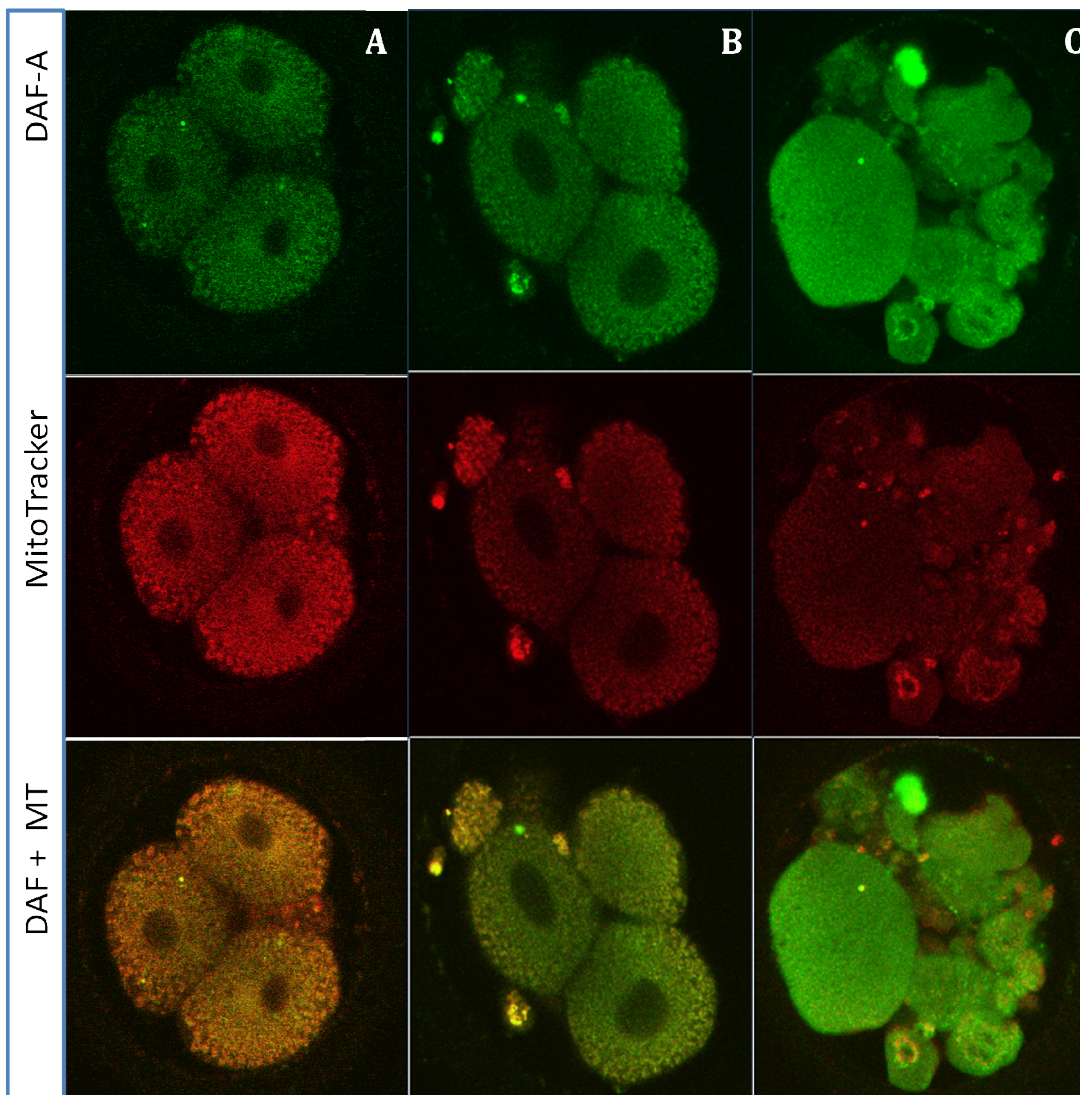
Značaj razlika u bioenergetskom statusu pojedinih delova embriona dobro je prikazan na **Slici 14**, sa uočljivo nejednakim prisustvom NO, među očuvanim blastomerama istog promera (b1 i b2), kao i među brojnim fragmentima.

4.3.3. Kolokalizacija mitohondrija i mesta gde je prisutan NO

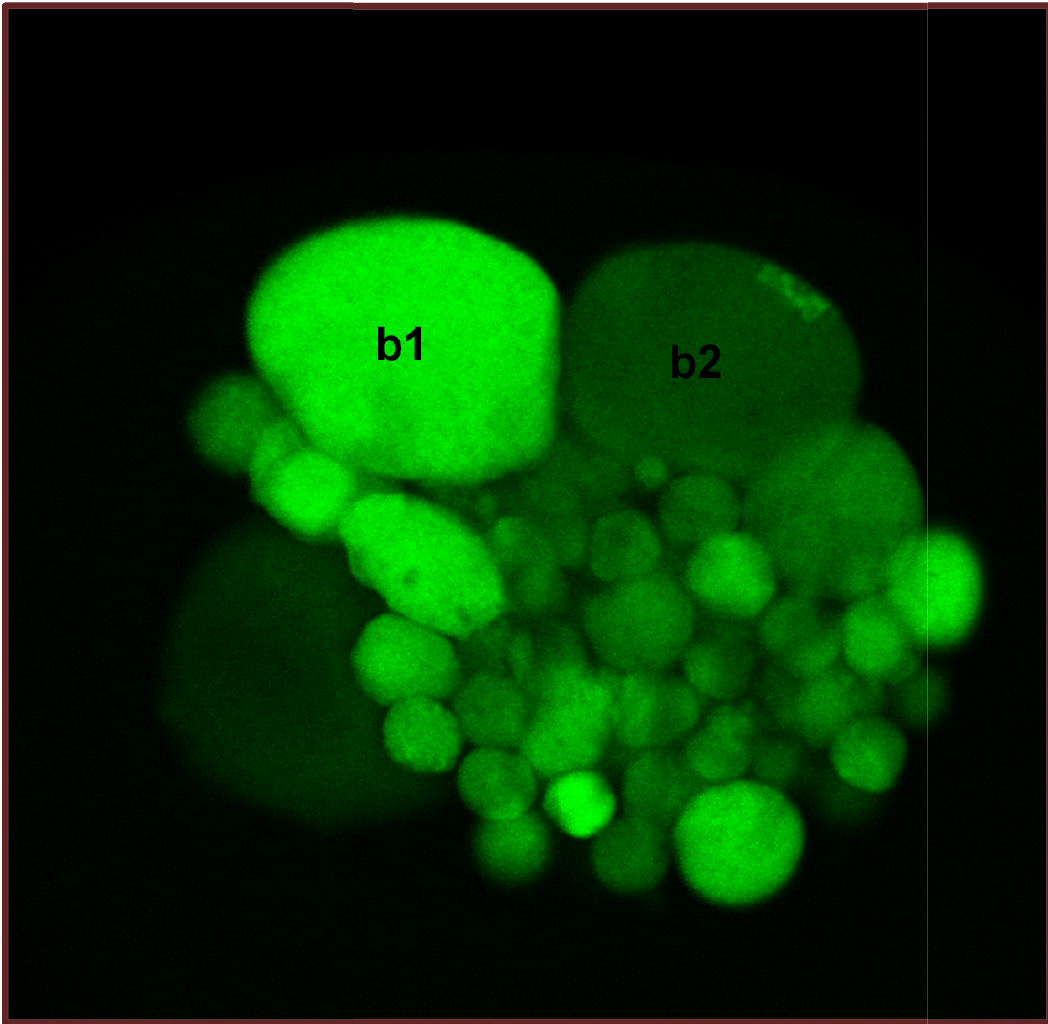
Kolokalizacija mitohondrija i NO u embrionima pokazala je jasnu korelaciju sa stepenom zahvaćenosti embriona fragmentima odnosno sa kvalitetom embriona. Relativna mera poklapanja ova dva bojenja, prikazana je uporednim postavljanjem konfokalnih preseka iste ravni sa uključenim filterima za: raspored mitohondrija (crveno, MitoTracker orange), prisustvo NO (zeleno, Daf2-DA) i njihovu kolokalizaciju (žuto). **Slika 13.a** prikazuje dva različita preseka kvalitetnog embriona, sa uočljivom distribucijom NO, mitohondrija i ostalih organela u. **Slika 13.b** pokazuje D2 embrione klase A, B i C uporedno, sa uočljivom redistribucijom NO i mitohondrija. Snimci pokazuju najmanje poklapanje u C klasi embriona, i najveće poklapanje u embrionima dobrog kvaliteta.



Slika 13.a. Embrion A klase, D3 i 8C stupanj, sa fluorescentno obeleženim NO (zeleno), mitohondrijama (crveno) i njihovom kolokalizacijom (žuto). Data su dva od serije konfokalnih preseka. Uvećanje: x63, orig.



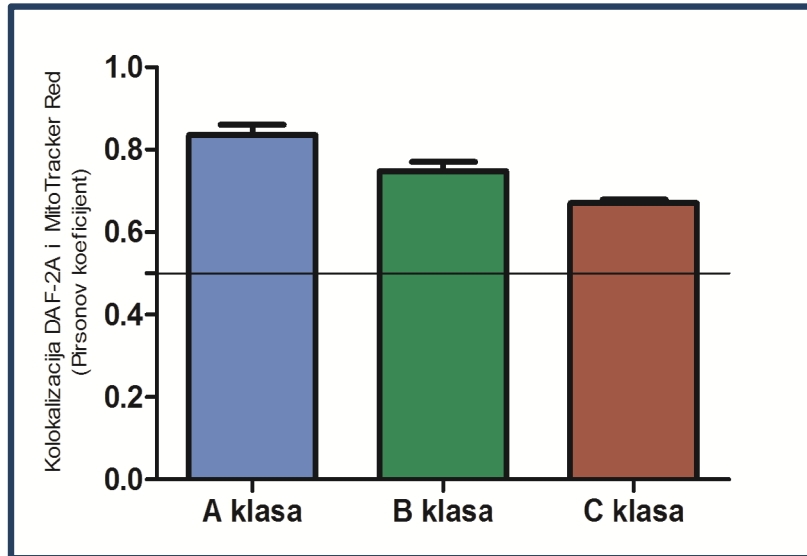
Slika 13.b. Embrioni A, B i C klase, D2 i 4C stupanj, sa obeleženim NO (zeleno), mitohondrijama (crveno) i njihovom kolokalizacijom (žuto). Sa višim stepenom fragmentacije, produkcija NO se povećava, kao i neravnomerna kolokalizacija sa mitohondrijama. Za razliku od embriona A klase gde se NO u najvećoj meri proizvodi u mitohondrijama zdravih blastomera, u klasi B najveći stepen kolokalizacije je u fragmentima, dok je kod embriona klase C gotovo u potpunosti izgubljena kolokalizacija i svedena samo na venac klastera mitohondrija oko vakuole u jednom od fragmenta. Takođe se uočava postepeno opadanje aktivne mitohondrijalne populacije sa stepenom fragmentacije. Uvećanje: x63, orig.



Slika 14. D3, $\approx 6C$ fragmentisani embrion, fluorescentno obeleženog NO.

Uvećanje: x63, orig.

Promenljiv stepen kolokalizacije NO i mitohondrija u embrionima različitog kvaliteta (A, B i C klasa) potvrđen je kvantitativnom softverskom analizom niza konfokalnih preseka i prikazan je u **Tabeli 3** i **Grafikonu 1**.



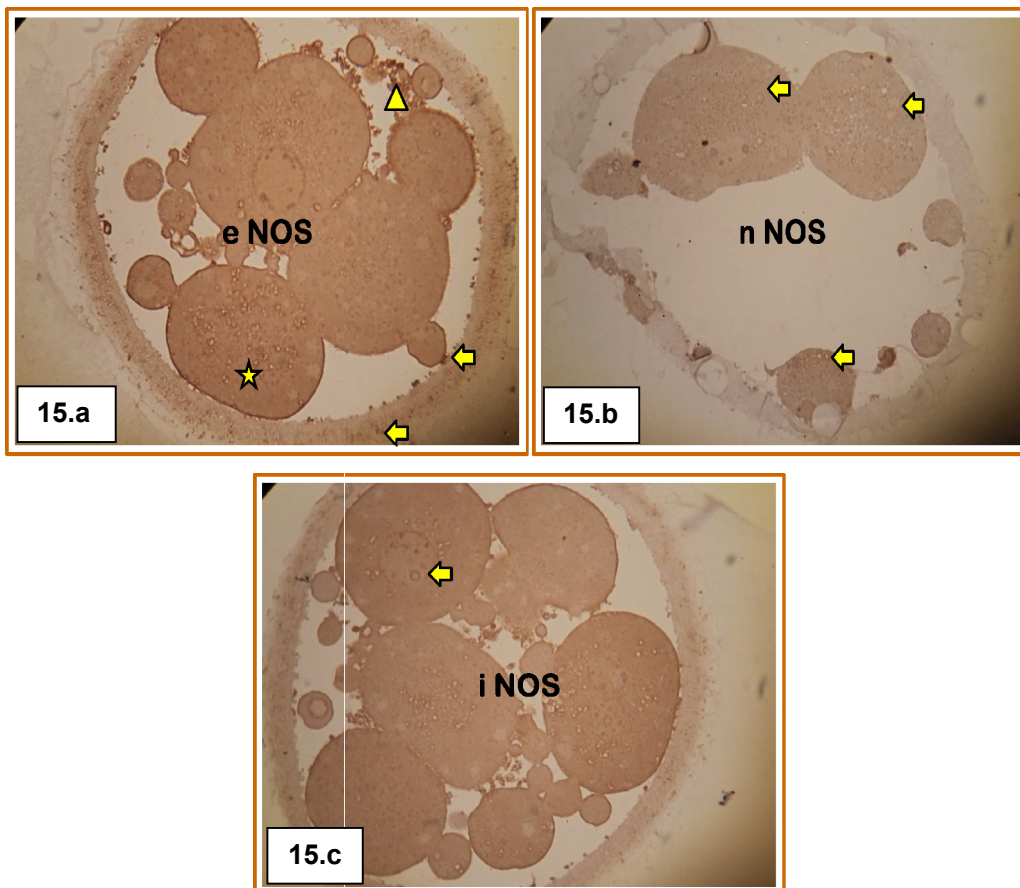
Grafikon 1: Stepen kolokalizacije NO i mitohondrija u embrionima A, B i C klase

Tabela 3. Vrednosti stepena korelacije po pojedinačnim odabranim regionima od interesa (ROI) konfokalnih preseka embriona A, B i C klase.

A klasa	B klasa	C klasa
0.899	0.778	0.605
0.924	0.742	0.680
0.827	0.733	0.667
0.808	0.719	0.673
0.798	0.697	0.678
0.756	0.678	0.675
0.679	0.654	0.691
0.888	0.735	0.695
0.900	0.870	0.688
0.878	0.869	0.649

4.4. Rezultati imunohistohemijskog obeležavanja izoformi NO sintaze (iNOS, eNOS, nNOS) na polutankim presecima

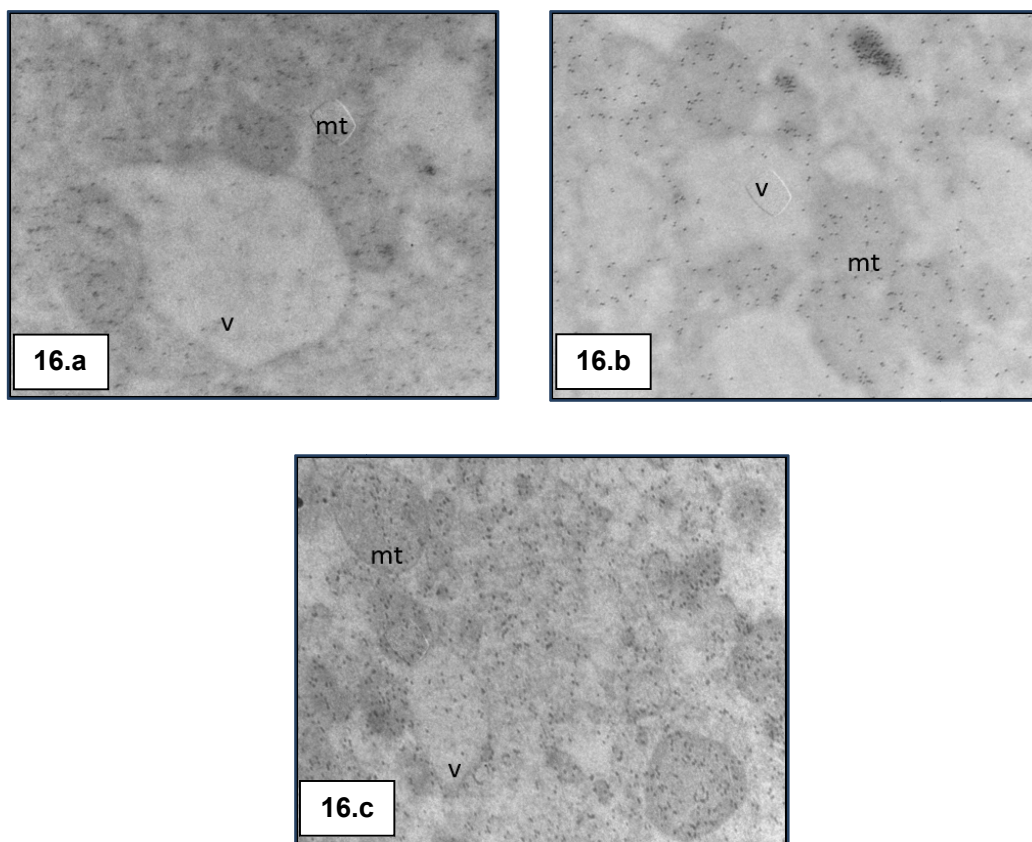
Lokalizacija NO sintaza prikazana je na Slici 15. za svaku od izoformi pojedinačno, na polutankim presecima istog embriona. Sve izoforme NOS opažene su pretežno u citoplazmi (blastomera označena zvezdicom). Najjače vezivanje imuno-kompleksa primećeno je u slučaju endotelijalne NOS (eNOS, Slika 15.a) koja je prisutna i u ZP, u vidu krupnijih nepravilno raspoređenih tačaka (strelice), u vanćelijskom detritusu (trougao) i na površini membrana blastomera okrenutih ka ZP. Uočena je jaka kolokalizacija mitohondrija i nNOS izoforme (15.b, strelica). iNOS je slabo prisutna u embrionu, izuzev u nekim delovima jedra (15.c, strelica).



Slika 15. Imunohistohemijska lokalizacija izoformi NO sintaze (15.a-eNOS, 15.b-nNOS i 15.c-iNOS). Uvećanje: x100 orig

4.5. Rezultati imunocitohemijskog obeležavanja ATP sintaze na tankim presecima

Imunocitohemijska analiza prisustva i distribucije ATP sintaze tokom fragmentacije pokazala je izrazitu imunogold pozitivnost, kako u mitohondrijalnoj populaciji, u nivou kristi, tako i u citoplazmi (Slika 16). Takođe, zapaža se da je samo u slučaju B i C klase embriona ATP sintaza prisutna i u vakuolama (16.c i 16.b).

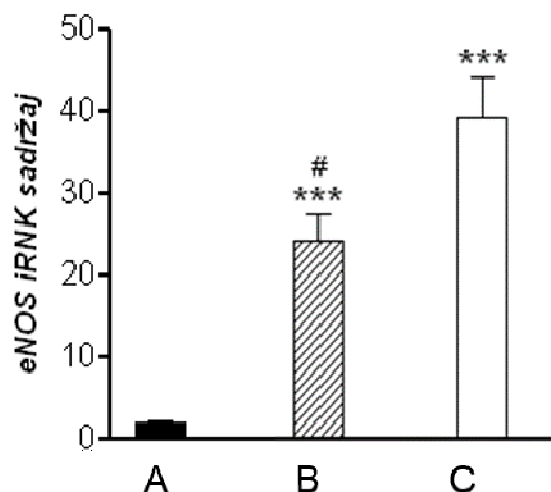


Slika 16. Imunocitohemijska lokalizacija ATP sintaze (16.a - A klasa, 16.b - B klasa, 16.c-C klasa). Uvećanje: x15000.

4.6. Rezultati molekularnih ispitivanja embriona na nivou ekspresije gena koji su od značaja za redoks ravnotežu

4.6.1. Genska ekspresija eNOS - rezultati poređenja na nivou stepena fragmentacije embriona

Kako je imunohistohemijska analiza pokazala da je preovlađujuća izoforma azot-oksida sintaze u ranom ljudskom embrionu eNOS, sledeći korak je bilo ispitivanje aktivnosti gena koji kodira ovaj protein kod normalnih i manje ili više fragmentisanih embriona (**Histogram 1**)

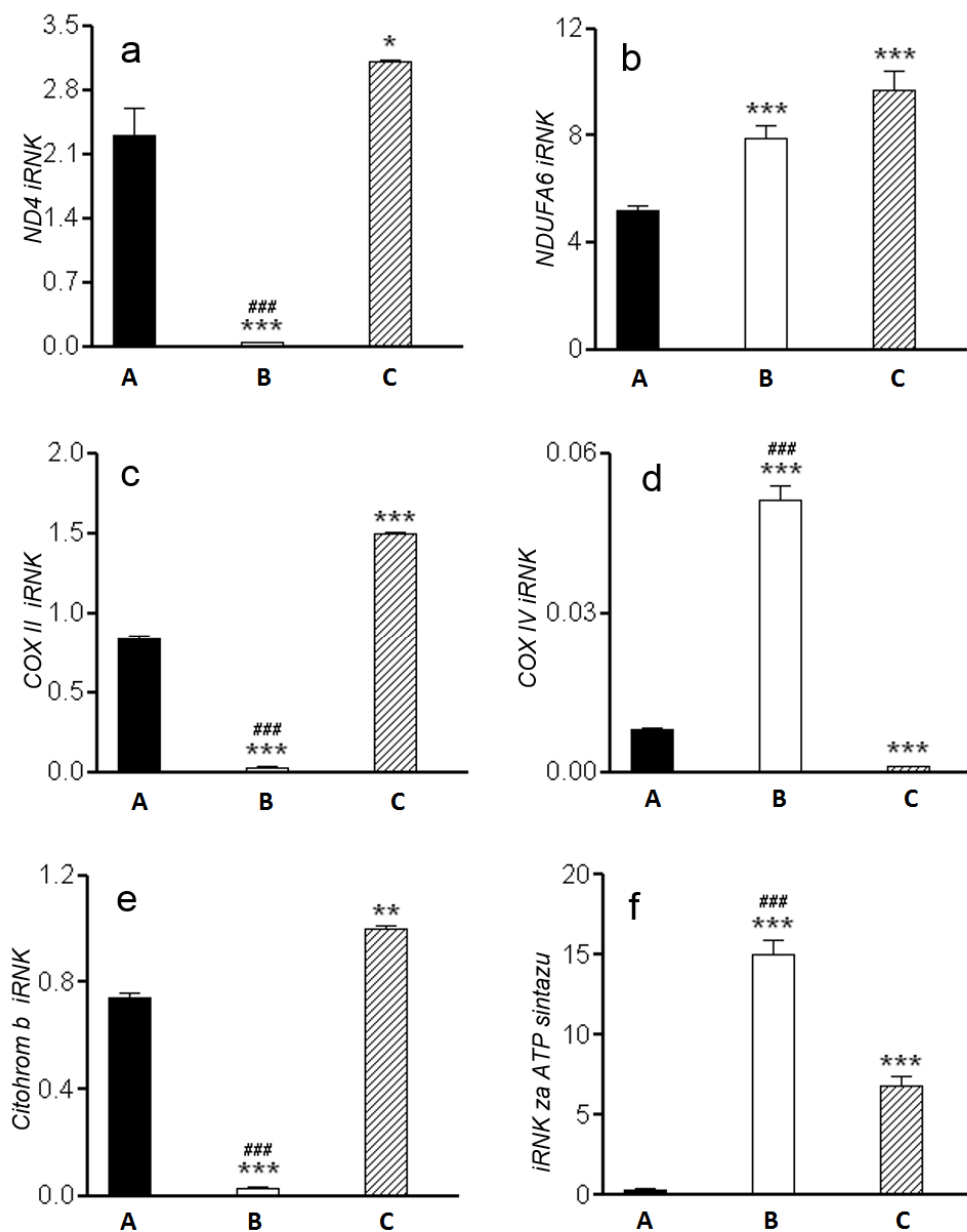


Histogram 1. Sadržaj eNOS iRNK

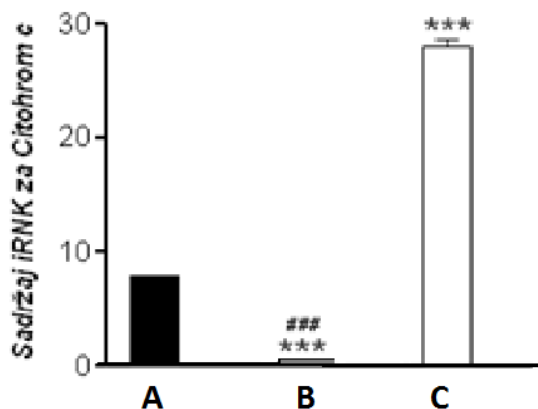
Ekspresija eNOS gena je u odnosu na A embrione (kontrola) povišena u embrionima B klase i izuzetno povišena u visokofragmentisanim C embrionima.

Stepen prepisivanja gena koji kodira protein koji stvara NO pokazuje izravnu pozitivnu korelaciju sa stepenom zahvaćenosti embriona fragmentima.

4.6.2. Promene ekspresije gena koji kodiraju komponente respiratornog lanca – rezultati poređenja na nivou stepena fragmentacije embriona



Histogram 2.(2.a -2.f) Razlike u ekspresiji gena za ND4, NDUFA6, COX II, COX IV, cit b i ATP sintazu u odnosu na kvalitet embriona (A,B, C klasa)



Histogram 2.g. Genska ekspresija *citohroma c* u embrionima A, B i C klase

Nivo iRNK svih ispitivanih komponenti respiratornog lanca, koje kodira mitohondrijalni genom – ND4 komponentu kompleksa I, subjedinicu II citohrom *c* oksidaze (COX II), kao i citohrom *b*, bio je značajno smanjen kod nisko-fragmentisanih embriona, u odnosu na kontrolne, kao i visoko fragmentisane embrione ($p < 0.001$).

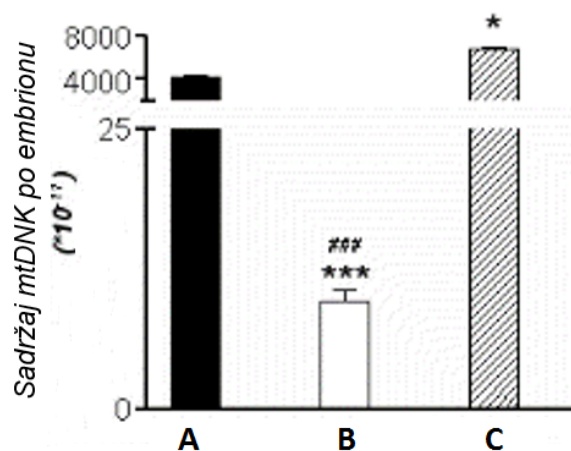
Sa druge strane, ekspresija subjedinica kompleksa I i IV, NDUFA6 i COX IV kodiranih nukleusnim genomom je povećana u poređenju sa kontrolnim, embrionima A klase (**Histogram 2.b i 2.d**).

Genska ekspresija *citohroma c* (**Histogram 2.g**) značajno je smanjena u embrionima blago zahvaćenim fragmentacijom, i u odnosu na istu kod kvalitetnih embriona, a posebno u odnosu na ekspresiju *citohroma c* u visokofragmentisanim embrionima, koja je značajno povišena u odnosu na A i B grupu embriona.

Genska ekspresija ATP sintaze (**Histogram 2.f**) je značajno povećana u obe klase fragmentisanih embriona u odnosu na kontrolne embrione A klase ($p < 0.001$). Međutim, ovaj nivo je veći kod nisko-fragmentisanih u odnosu na visoko-fragmentisane embrione ($p < 0.001$).

4.6.3. Ukupan sadržaj mitohondrijalne DNK kod embriona različitog kvaliteta

Najniži sadržaj Mt DNK imaju embrioni ocenjeni kao B, tj. u manjoj meri pogodeni fragmentacijom. Morfološki savršeni embrioni imaju veći sadržaj mitohondrijalne DNK u poređenju sa B embrionima, ali je količina Mt DNK u poređenju sa obe ove grupe daleko veća kod embriona koji su imaju visok stepen fragmentacije (C klasa).

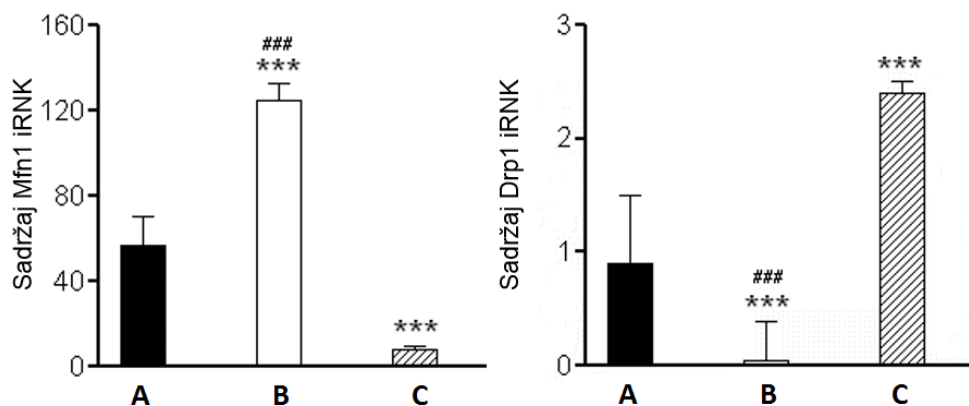


Histogram 3. Ukupan sadržaj mitohondrijalne DNK u embrionima A, B i C klase

4.6.4. Ekspresija gena koji regulišu remodeliranje mitohondrija (proteini regulatori fuzije i fisije mitohondrija)

Ekspresija mitofuzina 1 (Mfn 1, **Histogram 4**, levo) je značajno povećana u embrionima kod kojih je fragmentacija zastupljena u manjoj meri (B klasa) dok je istovremeno kod ovih embriona ekspresija gena koji regulišu fisiju mitohondrija, Drp 1 izuzetno smanjena.

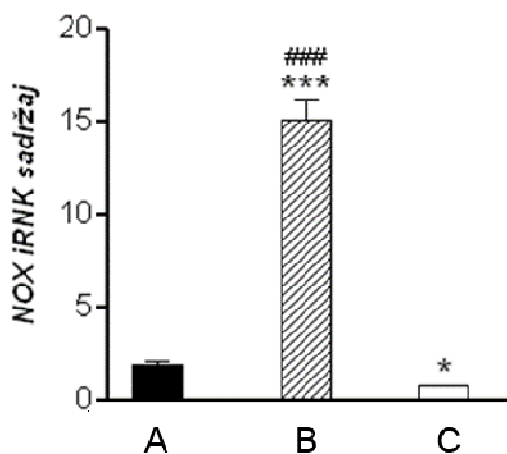
Genska ekspresija Drp 1 je izrazito povećana u visoko-fragmentisanim embrionima, dok je u istim embrionima ekspresija mitofuzina 1 izrazito smanjena, u odnosu na kontrolne, embrione bez fragmentacije (A klasa).



Histogram 4. Ekspresija gena za mitofuzin (Mfn1) i Drp1 kod embriona različitog kvaliteta (A, B i C klase)

4.6.5. Ekspresija gena NADPH oksidaze (NOX4)

Aktivnost gena NOX4 koji kodira protein iz porodice NADPH oksidaza, koje prikupljajući elektrone stvaraju reaktivne vrste kiseonika (ROS), tačnije superoksid anjon radikal, prikazana je kod normalnih i manje ili više fragmentisanih embriona (**Histogram 5**). Ekspresija gena NOX je značajno povišena unutar embriona B klase (niskofragmentisani), dok je izuzetno snižena u visoko fragmentisanim embrionima (C klasa). Korelacija je u ovom slučaju obrnuto zavisna od stepena pogodnosti embriona.



Histogram 5. Ekspresija gena za NOX kod embriona različitog kvaliteta (A, B i C klase)

5. DISKUSIJA

5.1. *Diskusija ključnih rezultata*

Embrioni su posmatrani na više istraživačkih razina u cilju rasvetljavanja fragmentacije kao razvojne pojave: ultrastrukturnom, na nivou funkcionalnosti organela i komponenti embrionovog redoks sistema. Mali broj dostupnih radova koji opisuju pojedinosti fine građe preimplantacionih embriona, na početku ovog istraživanja predstavljalo je veliki izazov, ali i teškoću sa tehnološke strane - nalazili smo se na metodološki nedovoljno pokrivenom polju. Promene utvrđene svetlosnom mikroskopijom potvrđene su i na strukturnom nivou, na polutankim presecima i na ultratankim presecima, pre ostalog uočena je reorganizacija organela – njihovo razmeštanje i grupisanje na određeni način. Po prvi put, koliko je nama poznato, opisana je pojava izuzetno krupnih vakuola okruženih prisno pozicioniranim mitohondrijama. Ultrastrukturno, pokazali smo da većina fragmenata sadrži mitohondrije, često izmenjenog izgleda, uvećane i takođe blisko povezane sa proširenim endoplazminim retikulumom, što je u suprotnosti sa podacima o fragmentima bez ikakvih organela (Van Blerkom i sar., 2001).

Brojni publikovani opisi fragmentisanih embriona naglašavali su pre svega patologiju procesa fragmentacije. Prva istraživanja su ovu složenu pojavu sagledavala sa mehaničke i patološke strane, tako je pored brojnih radova o vezi fragmentacije i apoptoze, kao u Jurisicova i sar. (1996.), Chi i sar. (2011.), dosta pažnje posvećeno sistematici i opisivanju tipova grupisanja fragmenata (Alikani i sar., 1999.). U tom periodu su učinjeni naponi da se razvojni potencijal fragmentisanih embriona popravi veštačkim uklanjanjem fragmenata isisavanjem iz embriona, ali je praksa pokazala da ovaj mehanički pristup nije dao očekivane rezultate, te da je fragmentacija mnogo složenija od pukog „raspadanja“ ćelija na sitne delove.

Iako je pokazano je da su fragmentacija i apoptoza bile prisutne u istim embrionima, one ne stoje u nedvosmislenom odnosu uzroka i posljedice. Naime apoptoza je česta u morfološki savršenim IVF embrionima kao prirodan regulator prekobrojnih ćelija tokom formiranja blastociste, što je istakla Hardy (1997.), dok je fragmentacija, kao izuzetno dinamičan razvojni sled, ponekad, ali ne po pravilu praćena apoptozom pojedinih blastomera (Fabian i sar., 2005., Schatten, 2004.). Naši rezultati kontrolne provere apoptoze bojenjem propidijum jodidom tokom fragmentacije nisu ukazali na suštinsku važnost ovog procesa, naprotiv, pokazali su da je embrion spreman da više puta izađe iz programa smrti koristeći različite organele i molekulske mehanizme, od kojih su neki prvi put opisani kod ranih embriona.

Naime, istraživanja su pokazala da su upravo mitohondrije embriona sabirno mesto više signalnih puteva, koje omogućavaju dvojaki ishod u sudbini embriona: put apoptoze (sa oslobađanjem *citohroma c* i okidanjem kaspaza-zavisne programirane ćelijske smrti) ili alternativni put posredovan oslobađanjem dodatnih proteina i signala, koji sa selektivnom mitoptozom (Lyamzaev, 2008.) i putem "anti-apoptoze" ćeliju odvede na put oporavka (Arnoult, 2007., Ulivieri, 2010., Sheridan i Martin, 2010.). Složena koordinacija fisije, fuzije i preraspoređivanja mitohondrija u ćelijama, kao i veze ovih pojava i oštećenja mitohondrija sa razvojem mnogih bolesti nije novost (Palmer i sar., 2011). Rezultati ovog istraživanja koji potkrepljuju ovakav scenario unutar ranih embriona biće pomenuti i delu sa molekularnim potvrdama aktivacije puta mitoptoze i fisije mitohondrija.

Kako je TEM-om ukazano na značaj mitohondrija u fragmentaciji sledeći istraživački korak bilo je njihovo ispitivanje na funkcionalnom i bioenergetskom nivou, u cilju prepoznavanja procesa koji su značajni za oporavak embriona i postavljanje zdrave energetske platforme za budući opstanak u materici i implantaciju. Činjenica da se mnogi embrioni lošeg izgleda i sa dosta fragmenata uspešno oporave i usade - ne može se zanemariti.

Unutar embriona je uočeno sortiranje mitohondrija: promenljivo razdeljivanje u fragmente i blastomere i njihovo grupisanje u klastere. Poznato je da se mitohondrije u ćelijama kreću aktivno, pomoću motornih proteina, i da su u neposrednom kontaktu sa ER, pogotovu u međusobnoj razmeni kalcijumovih struja, koje su neophodne u aktivaciji mitohondrija tokom fertilizacije oocite (Dalton i Carroll, 2013., Lawrence i Mandato, 2013.)

Više istraživanja potvrdilo je značaj bliske veze mitohondrija i sER sistema, te redoks-ravnotežnog i signalnog uticaja jona kalcijuma za proces dozrevanja oocita, fertilizacije i ranog embrionalnog razvoja. Ipak, aktivna ravnotežna uloga mitohondrija u rukovanju zalihama Ca^{++} nije u potpunosti jasna i predmetom je istraživanja. Novi podaci govore da mitohondrije uspešno prate brzu razmenu ćelijskih Ca^{++} signala posredstvom posebnih makromolekulskih kompleksa stvorenih zajedno sa jonskim kanalima ER cisterni (Romagnoli, 2007.). Time mitohondrije i ER stvaraju posebnu 3D mrežu koja je osnova održanju homeostaze ćelije. Novi literaturni podaci samo potvrđuju značaj ove signalne mreže u pitanjima života i smrti: postojanje posebnih "hot spots" za preuzimanje i oslobađanje većih količina kalcijuma koji stoje u neposrednoj blizini ER kanala za kalcijum, time i mogućnosti brzog ili produženog odgovora na nivou ćelijske membrane (Rzzuto i sar., 2004.). U svetlu svega rečenog potvrđivanje strukturne bliskosti mitohondrija i ER, u ovom radu, je važan detalj, i u smislu remodelovanja/reorganizacije mitohondrijalne populacije.

Prva velika reorganizacija mitohondrija dešava se u vreme formiranja deobnog vretena nezrele oocite, a druga u vreme formiranja prve polocite, kada se one aktivno udaljavaju od mesta deobe (Dalton i Carrol, 2013., Coticchio i sar., 2013.) Proizvodnja ATP u to vreme je promenljiva, i pod uticajem neposrednog okruženja, ćelija kumulusa kao i prethodne životne istorije: majčinog metaboličkog statusa i načina ishrane (Dalton i Carroll, 2013.). Sada je pokazano da se mitohondrije na sličan, aktivan način ponašaju i u ranim

embrionima, bez obzira na činjenicu da u ovom periodu još nisu dosegle svoju "punu funkcionalnost" (Ramalho-Santos i sar., 2009., Nagy i sar., 2012.).

Poznato je da mitohondrije u ogromnom broju pristižu u oocitu putem citoplazmatskih mostova tokom oogeneze. A takve pojave imamo i u tkivima odraslih, kada se ćelije srca oporavljaju posle ishemičnog šoka, putem neposrednog međućelijskog priliva respiratorno očuvanih mitohondrija iz susednih presađenih kardiomioblasta (Pankotai i sar., 2012.).

Na strukturnom nivou unutar blastomera utvrđena je bliska veza između membrana ER i mitohondrije, karakteristična izmenjenost izgleda mitohondrija koje grade agregacije oko cisterni ER. Pokazan je i scenario mitoptotske eliminacije oštećenih mitohondrija, pored klasične autofagije/mitofagije posredstvom lizosomskog sistema. U fragmentima je izgled mitohondrija bio naglašeno izmenjen u odnosu na tipičnu organelu kakva odlikuje oocite.

Pored toga je ukupna količina MtDNK varirala u embrionima zavisno od njihovog kvaliteta, odnosno stepena fragmentacije. Visok broj kopija MtDNA u zreloj oociti (40.000 – 50.000) bi trebalo da kao zaliha premosti potrebe do novog ciklusa replikacije mitohondrijalnih DNA odnosno biogeneze novih mitohondrija (Wai i sar., 2010.) U periodu kada embrion trpi velike promene, a brazdanje bude praćeno fragmentacijom - ova zaliha može biti od značaja za opstanak i održavanje kvalitetne mitohondrijalne zajednice. Značaj ukupne Mt DNK u ranoj embriogenezi je prepoznat od više autora: Carling i sar. (2011.) ih pominju kao mogući marker vijabilnosti embriona; Chiaratti i Meirelles (2010.) podvlače da nove sinteze nema do perioda implantacije!

Naše ispitivanje broja kopija MtDNK govori da je u visokofragmentisanim embrionima prisutna znatno povišena količina MtDNK, u odnosu na ukupan sadržaj MtDNK A klase embriona, dok se u ranim fazama fragmentacije broj ovih kopija gubi (Otašević i sar., 2014.). Ovakav rezultat govori u prilog složenoj i usaglašenoj reakciji embriona i na nivou replikacije MtDNK, mogućem aktivnom uklanjanju oštećenih kopija, i upućuje na istraživanja i moguću reviziju dogme o odloženoj sintezi MtDNK u ranim embrionima.

Dalji uvid u stanje mitohondrijalne populacije dalo je praćenje ekspresije ključnih proteina koji posreduju u njihovoj fuziji odnosno fisiji. Ova dva prividno suprotstavljena procesa deo su urođenog i evolutivno konzerviranog sistema održanja kvaliteta i brojnosti mitohondrija unutar ćelija. Rezultati su pokazali da su blago fragmentisani embrioni (B klasa) imali povišenu ekspresiju mitofuzina 1 i istovremeno sniženu ekspresiju Drp 1. Suprotno tome embrioni C klase, sa najviše fragmenata, imali su sniženu ekspresiju Mfn1 i znatno povišenu ekspresiju Drp 1 proteina. Ove promene govore u prilog većih šansi za oporavak B embriona, i značaju suradnje i razmene delova membrana i matriksa kod ovih organela u održanju mitohondrijalne populacije. Istovremeno stišana aktivnost posrednika fisije kao i smanjena količina Mt DNK kod niskofragmentisanih embriona pokazuje dodatnu „ekonomičnost“. Molekulski pokazatelji koji su ukazali na promenljiv odnos fuzije i fisije u ranim fazama fragmentacije i mikroskopski dokazi preraspodele mitohondrija unutar ranih embrionima su samo dva odraza istog procesa samoodržanja.

Prvi rezultati su pokazali da je u ranim embrionima na delu značajna i brza preraspodela i promene izgleda mitohondrija, ali ne i šta je sa njihovom funkcionalnošću? Na molekulskom nivou ona se očituje u stanju enzimskih kompleksa koji su nosioci transportnog lanca elektrona i procesa oksidativne fosforilacije. Pokazano je da su upravo ovi proteinski kompleksi pogođeni u ranom razviću, i to u skladu sa stepenom pogođenosti embriona fragmentacijom (Otašević i sar., 2014.). Pokazatelji stanja kompleksa OXPHOS govore da je svaka „neregularna“ transkripciona (in)aktivacija mitohondijalno kodiranih komponenti respiratornog lanca povezana sa fragmentacijom embriona. Naime, rezultati genske ekspresije OXPHOS ukazuju na vezu funkcionalnosti mitohondrija i obima fragmentacije. U odnosu na “idealne” embrione date mitohondijalno kodirane komponente respiratornog lanca pokazale su “stišani” odnosno “pojačani” metabolički odjek. Nasuprot tome, transkripcija ATP sintaze bila je povišena i u B i C klasi embriona, u odnosu na

“tihe” A embrione, i moguće je da ukazuje na veće potrebe za energijom i povećanjem prometa ATP tokom procesa fragmentacije.

S druge strane, promene transkripcije subjedinica kompleksa I i IV, kodiranih jedarnim genomom, kod embriona sa različitim stepenom fragmentacije ukazale su da „modulatorni“ uticaj jedra pokazuje drugačiju vremensku (rana ili odmakla fragmentacija) i prostornu (mesto intervencije unutar respiratornog lanca) šemu delovanja. COX se smatra ključnim regulatornim faktorom respiratornog lanca, tj. prepoznat je kao ključni faktor preživljavanja, stecište više signalnih puteva uključujući i regulaciju od strane jedra (Arnold, 2012.). U našem radu je *citohrom c* pokazao stišanu transkripciju u blago fragmentisanim embrionima, i u poređenju sa kvalitetnim, a pogotovu sa visokofragmentisanim embrionima. Kako je masovno otpuštanje *citohroma c* okidač puta apoptoze, nije bez značaja što je u embrionima najlošijeg izgleda izmerena najveća prisutnost *citohroma c*. Ako se količina *citohroma c* u A klasi embriona smatra fiziološki optimalnom, B embrioni su pokazivali vidnu „stišanosť“ u ovom pogledu, što ukazuje na moguće delovanje mehanizama koji će aktivno sprečiti put u programiranu ćelijsku smrt, dok su na delu ostali procesi oporavka. Ovi rezultati ukazuju da je nivo respiracije u ranim embrionima pod stalnim nadzorom kontrolnih sistema i da je krajnji scenario oksidativne smrti pokrenut kada ćelije više nisu u stanju da podešavaju svoj redoks status. Put apoptoze ili put unutrašnje reorganizacije, uklanjanja loših mitohondrija mitoptozom, njihovog remodeliranja putem fisije ili fuzije - stoje u nekoj vrsti vitalne raskrsnice. Naši rezultati ukazuju na to da su: fragmentacija delova blastomera, sortiranje mitohondrija i značajne razlike u sadržaju Drp1 i Mitofuzin 1 proteina - upravo značajke koje čine tu raskrsnicu. Rezultati su u skladu sa radovima koji su potvrdili značaj koordinacije fisije/fuzije, preraspodele, kretanja i promene izgleda mitohondrija u nastanku mnogih bolesti i povezanošću ove dinamike s apoptozom (Palmer i sar. 2011., Sheridan i Martin, 2010., Skulachev, 2006.).

Ostaje suštinsko pitanje kako brazdajući embrion održava svoju energetska ravnotežu i razvojni plan raspolažući: „polu-funkcionalnim“ mitohondrijama, isključivo maternalnim DNK prepisima i pri tom boraveći u promjenljivoj i epigenetski „stranoj“ sredini, bilo da je to jajovod ili petri šolja?

Imajući na umu da se ove promene u stvarnom vremenu odvijaju izuzetno brzo (i fragmenti se pomeraju unutar embriona i nestaju i pupe u samo par minuta) tada i ključni faktori koji povezuju strukturu i odgovor na nivou fiziologije/funkcije - moraju biti jednako „dinamični“ i brzi.

Takav kandidat pronađen je u azot oksidu (NO), signalnom molekulu u okviru živih sistema. Značaj NO kao „efektora“ apoptoze, koji zavisno od dodatnih pokazatelja zdravlja ćelije, može da podstakne ili zaustavi apoptozu, prepoznat je još 90-tih godina (Brune i sar., 1999.) Ova vrsta „modulatornog“ uticaja NO u fiziologiji ranih embriona je donekle očekivana i predmetom je naučnih ispitivanja, ali je još daleko od potpunog razjašnjavanja (Gouge i sar., 1998., Manser i Houghton, 2006., Gallinelli i sar. 2009.)

Fluoroscentno bojenje embriona pokazalo je snažno prisustvo NO u ranim embrionima, njegov neujednačen raspored unutar embriona, i među blastomerama i fragmentima. Pokazana je i značajna kolokalizacija NO i mitohondrija, a gubitak ove kolokalizacije u skladu je sa stepenom fragmentacije embriona. Odgovor na pitanje koja je od poznatih izoformi NOS prisutna u ranim embrionima dalo je imunohistohemijsko obeležavanje, gde je potvrđeno prisustvo sve tri izoforme NOS, nešto veća kolokalizacija nNOS sa mitohondrijama, ali i prisustvo imunokompleksa van embriona u području ZP, koje ukazuje na moguće tragove NOS iz prethodnog okruženja, tj. folikula kao mesta egzogenog doprinosa NO regulaciji tokom rasta i dozrevanja oocita.

Relativna ujednačenost prisustva NO u kvalitetnim embrionima može ukazivati na relativnu stabilnost signalnih puteva i postojanje privremene ravnoteže kod „idealnog“ razvojnog toka. Kako su i morfološki savršeni embrioni imali „vrela NO mesta“ i pokazali neujednačen raspored NO kroz seriju konfokalnih preseka, dok su osrednji i pogotovu loši embrioni pokazali

progresivno sve veće neujednačenosti rasporeda NO – tako se i proizvodnja NO ubraja u red značajnih razvojnih činioca. Prekomerna ili znatno utišana aktivnost NOS ukazuje na lokalne energetske poremećaje. Visoko prisustvo NO znak je oksidativnog stresa i puta ka NO-posredovanoj ćelijskoj smrti dok je potpuna utišanost odraz metaboličkog gašenja i umiranja na drugi način. Značaj reaktivnih kiseonikovih vrsta u ovom radu je samo dotaknut, ispitivanjem enzima koji produkuje ROS i također pokazuje gensku ekspresiju zavisnu od stepena fragmentacije.

Zbog svoje visoke reaktivnosti i prodornosti kroz ćelije NO predstavlja molekul na granici energetske pojavnosti, i zavređuje posebnu istraživačku pažnju. Kao slična istraživačkoj platformi u ovom radu, ističe se studija Martinoa i sar, 2013. kojom je ispitivana bezbednost vitrifikacije embriona, tj. post-krio oštećenja na nivou populacije mitohondrija, produkcije NO i statusa hromozoma, nedvojbeno pokazavši da su različiti razvojni stupnjevi: rani brazdajući embrion, morula i blastocista imali značajno različitu osetljivost i stepen krio-oštećenja svakog od ova tri posmatrana sistema.

Zastoj embriona i prestanak deoba u toku preimplantacionog razvoja je pre svega biološki opravdana, samoregulatorna razvojna pojava. Neki podaci govore i da 50% embriona zastane u prvoj nedelji razvoja kao i da svega trećina D3 embriona dosegne stupanj blastociste u IVF kulturi. (Leese i sar., 1993.) Rani zastoj razvića se ispituje pre svega na genetičkom, ali i metaboličkom i matematičko-konceptualnom nivou (Hardy i sar., 2001.). Između ostalih, Betts i Madan (2008.) ponudili su podsticajan koncept koji se delom slaže i sa našim rezultatima. U njihovom radu je podvučeno kako su jedro i mitohondrije u posebno bliskoj vezi tokom ranog razvića i da je uloga reaktivnih vrsta poreklom iz mitohondrija izuzetno značajna za jednu od alternativnih sudbina - apoptoza ili embrionov zastoj. Autori navode da 15% embriona ima zastoj u stupnju od 2C-4C, bez znakova apoptoze, ali pokazuju metaboličku aktivnost i povišene nivoe ROS.

Tehnike PGS/PGD ponudile su nove uvide u hromozomski status sporih i nepravilno razvijanih embriona, odbačenih po standardnim morfološkim kriterijumima. Unutar euploidne grupe, i ovakvi embrioni su pokazali očuvanost razvojnog potencijala, te bili krioprezervirani i naknadno vraćani. Njihov loš izgled nije bio presudan za implantacioni potencijal (Capalbo i sar., 2014.). Krupne opravke na nivou genoma, pokazane tokom eksperimentalne kulture embriona do D13, tima Dekel-Naftali i sar. (2013.), sa smanjenjem broja aneuploidnih ćelija unutar pojedinačnog embriona i značajnom povećanju proporcije normalnih embriona tokom produženog gajenja govore da je razvojni potencijal veoma promenljiva kategorija.

Povezivanje zastoja embriona sa već diskutovanim rezultatima nije potpuno bez istraživanja na posebnoj kohorti - embrionima u ranom zastoju. Tako bi saznanja o ultrastrukturnim i molekularnim promenama, dobijena unutar ove studije bila upoređena sa istim pristupom embrionima koji su prestali sa deobama na stupnju zigota, 2C itd. U tom smislu, ovaj rad je ponudio uvid u osnovne ultrastrukturne i metaboličke pokazatelje vitalnosti onih embriona koji na krupnom planu razvijaju fragmente kao znak borbe, dok embrionalni zastoj kao pojava zahteva još širi i sveobuhvatniji pristup.

5.2. Klinički i patofiziološki značaj rezultata rada

Sve uočene i diskutovane promene na embrionima: stanje mitohondrijalne zajednice, održanja redoks ravnoteže, mehanizama apoptoze, mitoptoze, prometa MVB i egzozoma uveliko se proučavaju na svim poljima patofiziologije i geneze bolesti, između ostalih neurodegenerativnih, autoimunskih oboljenja, mehanizama tumorogeneze itd. Na taj način saznanja o istim pojavama koja su praćena kod preimplantacionih embriona, dakle u najranijem periodu razvoja, doprinose izgradnji osnovne platforme na kojoj se procesi kako normogeneze tako i patogeneze objedinjuju i tumače.

Primera radi, gojaznost kao stanje koje negativno utiče na ishode IVF postupaka, kliničarima predstavlja teškoću zbog nemogućnosti kontrole odgovora na zadatu stimulaciju jajnika, i neretko od pacijentkinja očekuju smanjenje težine pre nastavka lečenja. Međutim, ovoj skupini pacijenata je i kvalitet dobijenih oocita pogođen, što nadalje kumulativno remeti normalan razvoj. Smatra se da su oštećenja nakupljena upravo na nivou mitohondrija (Igosheva i sar., 2010.). O dugotrajnom dometu molekulskog nasleđa oocite govore i studije gde je praćen odgovor na stimulaciju kod pacijentkinja koje su dijetom snizile težinu, i uprkos što je kod njih dobijeno više MII oocita, do pomaka u pogledu kliničkih ishoda nije došlo (Chavarro i sar., 2012.). Studije na miševima su potvrdile sa su gojazne jedinke imale povišen mitohondrijalni membranski potencijal, povećanu produkciju ROS u ćelijama embriona, kao i nejednaku raspodelu mitohondrija unutar oocite i među blastomerama (Igosheva i sar., 2010.). Starost pacijentkinja se već dugo smatra značajnim činiocem kod preračunavanja šansi za uspeh IVF postupka, uvek u smislu negativnog uticaja odmaklih godina, ali je odskora pružen i uvid u reproduktivni potencijal grupe najmlađih pacijentkinja, gde je mlađa uzrasna grupa imala niže stope fertilizacije, manju proporciju kvalitetnih embriona i veću stopu pobačaja, uprkos sličnim stopama implantacije (Nazemian i sar.2011.).

Ovde su izdvojene gojaznost ili starost kao primeri, ali se i ostale osobenosti načina života i to kod oba partnera trebaju uzimati u obzir. One mogu dovesti do višestrukih i subćelijskih promena, koje se nakupljaju i odražavaju na kvalitet gametogeneze, a potom i embriogeneze.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ispitivanja ultrastrukturnih i molekulskih promena tokom fragmentacije ranih embriona, zaključujemo da je zastoj u razviću posledica koordinisanih i usko povezanih poremećaja strukture, funkcije i energetskeg balansa preimplantacionih humanih embriona.

Jednako kako svi homeostatski biološki sistemi deluju usaglašeno i brzo, krupne i brze strukturne promene unutar fragmentisanih embriona praćene su brzim odgovorom na nivou metabolizma. Naizmenično stišavanje i aktiviranje bioenergetskih procesa u skladu sa potrebama embriona je imperativ razvića u kritičnom, preimplantacionom periodu (opravke, „nevidljive“ G1/G2 i naglašene smene S i M faze, aktivacija embrionovog genoma, prelaz sa jednog energetskeg supstrata na drugi). Dok je u višecelijskom okruženju cena apoptoze nekoliko ćelija mala i donosi benefit celom organizmu - cena apoptoze nekoliko blastomera tek nastalog embriona čini razliku između života i smrti individue. Stoga i mehanizmi održanja koji na u ovom periodu deluju nemaju iste prioritete.

Dogma o „idealnom tihom embrionu“ i „quietness“ na nivou dinamike fragmenata, kretanja mitohondrija, rada protonskih pumpi i pretvaranja energije - zapravo ne postoji. Čak i morfološki savršeni embrioni, sa niskim stepenom respiracije i potrošnje kiseonika nisu „tihi“. U isto vreme, fragmenti ostaju „noćna mora“ embriologa i dogmatsko slaganje po pitanju suštinskih uzroka fragmentacije i zastoja embriona je van našeg dometa.

S tim u skladu izdvojeno je nekoliko zaključaka:

1. Strukturne promene uočene svetlosnom, a potom i elektronskom mikroskopijom pokazuju visoku promenljivost populacije fragmenata u funkciji vremena, kao i reverzibilnost u pogledu obima i vezu ove pojave sa nastavkom razvoja.
2. Mitohondrije ranih embriona su značajan činilac u dinamici fragmentacije: mehanizmi njihovog aktivnog sortiranja, uklanjanja, promene izgleda i

uspostavljanja posebnih veza sa ER potvrđeni su na nivou TEM i u korelaciji su sa stepenom fragmentacije.

3. Mehanizmi remodeliranja mitohondrija aktivni su unutar ranih embriona i pokazuju visoku podešenost sistema fisije i fuzije mitohondrija u zavisnosti od stepena fragmentiranosti embriona.
4. Mitoptoza kao osoben put kontrole kvaliteta mitohondrijalne populacije (brzo i delotvorno uklanjanje visoke proporcije oštećenih mitohondrija u cilju opstanka ćelije), jednako kao i u drugim biološkim sistemima pokazana je i na TEM mikrofografijama ranih embriona.
5. Rani embrioni pokazuju visoku plastičnost redoks sistema: ona se očituje u osobenim načinima ekspresije gena OXPHOS i ATP sintaze u zavisnosti od kvaliteta embriona. Sve ispitane komponente pokazale su ovu „podesivost“ aktivnosti iako mitohondrije preimplantacionih embriona slove za „nepotpuno funkcionalne“.
6. NO, kao potvrđen i važan nosilac ćelijskih signalnih i puteva preživljavanja, u ranim preimplantacionim embrionima je pokazao visoku opštu prisutnost, promenljivu produkciju unutar embriona i nedvojbenu vezu stepena fragmentacije sa dinamikom njegove proizvodnje i kolokalizacije sa populacijom embrionovih mitohondrija.
7. Pokazano je, po našim saznanjima prvi put, da se u ranom ljudskom embrionu, dakle na izuzetno ranom stupnju razvoja – oslobađaju egzozomi, i od strane blastomera i fragmenata. Njihov značaj u međućelijskoj komunikaciji potvrđen je u brojnim organskim sistemima.
8. Sumirani rezultati ispitivanja ultrastrukture embriona, funkcionosti i remodeliranja mitohondrija, distribucije i aktivnosti enzima redoks ravnoteže, ukazuju na to da je embrion u ovom periodu izložen visokom pritisku i da očekivano pribegava rešenjima koja, u poređenju sa „običnim“ ćelijama izgledaju ekstremno.

Moderni merni instrumenti i analitički softverski alati u budućim istraživanjima bi trebalo da doprinesu integrisanom povezivanju strukture i funkcije, pre svega promatranjem sve finijih bioenergetskih pojava, po svojoj fizičkoj prirodi teško uhvatljivih, promenljivih, što predstavlja ne samo tehnički već i konceptualni izazov! Sagledavanje fragmentacije sa svega nekoliko standardnih metoda pokazalo je značaj sintetičkog pristupa u sagledavanju energetike i dinamike razvića. Umesto da se svaki put kada uočimo fragmentaciju embriona zapitamo „šta smo uradili pogrešno“ ili „šta je pošlo naopako“ – može li promena fokusa biti od koristi ART praktičarima? Uvođenje novih lekova, dodataka medijumima, unapređenje protokola „kontrolisane“ stimulacije – oslonjeni su na tehnologiju staru ne više od pola stoleća. Kako su sva poboljšanja učinjena u cilju unapređenja uslova gajenja embriona i povećanja kontrole tih uslova (eng. quality control, QC) ne treba nikada zaboraviti sledeće: razvojno polje i program oocite kao početne fizičke osnove embriona podešavan je milionima godina po najstrožijim principima „kontrole kvaliteta“. Sprovedena je i prirodna selekcija gameta, koja se nastavlja u kohabitaciju zigota i embriona sa neposrednim fizičko-energetskim okruženjem. Drugim rečima, sva uočena i još neotkrivena „rešenja“ i mehanizmi opravke su nastali i provereni tokom evolutivne istorije živog sveta i deluju unutar živih sistema u skladu sa prirodnim zakonima.

7. LITERATURA

- ACTON, B. M., JURISICOVA, A., JURISICA, I. & CASPER, R. F. 2004. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod*, 10, 23-32.
- ALIKANI, M. 2007. *The origins and consequences of fragmentation in mammalian eggs and embryos*, London: Informa Healthcare.
- ALIKANI, M., CALDERON, G., TOMKIN, G., GARRISI, J., KOKOT, M. & COHEN, J. 2000. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod*, 15, 2634-43.
- ALIKANI, M., COHEN, J., TOMKIN, G., GARRISI, G. J., MACK, C. & SCOTT, R. T. 1999. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*, 71, 836-42.
- ALIKANI, M., SCHIMMEL, T. & WILLADSEN, S. M. 2005. Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder. *Mol Hum Reprod*, 11, 335-44.
- ALIKANI, M., TOMKIN, G., FERRY, K. & GARRISI, M. 2008. High pregnancy loss rate following implantation of IVF human embryos with extensive fragmentation. *Fertil Steril*, 90, S113-S114.
- ANTCZAK, M. & VAN BLERKOM, J. 1999. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod*, 14, 429-47.
- ARNOLD, S. 2012. The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion*, 12, 46-56.
- ARNOULT, D. 2007. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 17, 6-12.
- BALAKIER, H., SOJECKI, A., MOTAMEDI, G., BASHAR, S., MANDEL, R. & LIBRACH, C. 2012. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertil Steril*, 98, 77-83.
- BEDAIWY, M. A., FALCONE, T., MOHAMED, M. S., ALEEM, A. A., SHARMA, R. K., WORLEY, S. E., THORNTON, J. & AGARWAL, A. 2004. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*, 82, 593-600.
- BEDAIWY, M. A., MAHFOUZ, R. Z., GOLDBERG, J. M., SHARMA, R., FALCONE, T., ABDEL HAFEZ, M. F. & AGARWAL, A. 2010. Relationship of reactive oxygen species levels in day 3 culture media to the outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*, 94, 2037-42.
- BETTENCOURT, E. M., BETTENCOURT, C. M., SILVA, J. N., FERREIRA, P., DE MATOS, C. P., OLIVEIRA, E., ROMAO, R. J., ROCHA, A. & SOUSA, M. 2009. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology*, 71, 947-58.
- BETTS, D. H. & MADAN, P. 2008. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. *Mol Hum Reprod*, 14, 445-53.
- BRUNE, B., VON KNETHEN, A. & SANDAU, K. B. 1999. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 969-75.

- CAPALBO, A., RIENZI, L., CIMADOMO, D., MAGGIULLI, R., ELLIOTT, T., WRIGHT, G., NAGY, Z. P. & UBALDI, F. M. 2014. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod*, 29, 1173-81.
- CARLING, P. J., CREE, L. M. & CHINNERY, P. F. 2011. The implications of mitochondrial DNA copy number regulation during embryogenesis. *Mitochondrion*, 11, 686-92.
- CASAN, E. M., RAGA, F. & POLAN, M. L. 1999. GnRH mRNA and protein expression in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*, 5, 234-9.
- CHAVARRO, J. E., EHRLICH, S., COLACI, D. S., WRIGHT, D. L., TOTH, T. L., PETROZZA, J. C. & HAUSER, R. 2012. Body mass index and short-term weight change in relation to treatment outcomes in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril*, 98, 109-16.
- CHEN, H. W., JIANG, W. S. & TZENG, C. R. 2001. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril*, 75, 1163-71.
- CHI, H. J., KOO, J. J., CHOI, S. Y., JEONG, H. J. & ROH, S. I. 2011. Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. *Fertil Steril*, 96, 187-92.
- CHIARATTI, M. R. & MEIRELLES, F. V. 2010. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. *Biol Reprod*, 83, 1-2.
- COHEN, S. & POPP, F. A. 2003. Biophoton emission of human body. *Indian J Exp Biol*, 41, 440-5.
- COMISKEY, M. & WARNER, C. M. 2007. Spatio-temporal localization of membrane lipid rafts in mouse oocytes and cleaving preimplantation embryos. *Dev Biol*, 303, 727-39.
- COTICCHIO, G., ALBERTINI, D. F. & DE SANTIS, L. 2013. *Oogenesis*, London ; New York, Springer Verlag.
- CUMMINS, J. M. 2004. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 115 Suppl 1, S23-9.
- DALTON, C. M. & CARROLL, J. 2013. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J Cell Sci*, 126, 2955-64.
- DEKEL-NAFTALI, M., AVIRAM-GOLDRING, A., LITMANOVITCH, T., SHAMASH, J., YONATH, H., HOURVITZ, A., YUNG, Y., BRENGAUZ, M., SCHIFF, E. & RIENSTEIN, S. 2013. Chromosomal integrity of human preimplantation embryos at different days post fertilization. *J Assist Reprod Genet*, 30, 633-48.
- DUMOLLARD, R., DUCHEN, M. & CARROLL, J. 2007. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol*, 77, 21-49.
- EBNER, T., MOSER, M., SOMMERGRUBER, M., YAMAN, C., PFLEGER, U. & TEWS, G. 2002. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod*, 17, 2415-8.
- EBNER, T., YAMAN, C., MOSER, M., SOMMERGRUBER, M., POLZ, W. & TEWS, G. 2001. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril*, 76, 281-5.
- ESHRE-SIG-EMBRYOLOGY, A.-S. 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*, 26, 1270-83.
- ESTERHUIZEN, A. D., VAN DER MERWE, J. V. & FOURIE, F. L. 1988. A preliminary study of the fine structure of in vitro fertilized human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 5, 315-25.
- FABIAN, D., KOPPEL, J. & MADDOX-HYTTEL, P. 2005. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*, 64, 221-31.

- FUJIMOTO, V. Y., BROWNE, R. W., BLOOM, M. S., SAKKAS, D. & ALIKANI, M. 2011. Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertil Steril*, 95, 1197-204.
- GALLINELLI, A., NICOLI, A., CAPODANNO, F., VALLI, B., FACCHINETTI, F. & LA SALA, G. B. 2009. Nitric oxide as an early marker of human embryo metabolic cleavage in ART using fresh or thawed oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 142, 48-52.
- GARDNER, D. K. 2013. *Human gametes and preimplantation embryos : assessment and diagnosis*, New York, Springer.
- GIORGETTI, C., TERRIOU, P., AUQUIER, P., HANS, E., SPACH, J.-L., SALZMANN, J. & ROULIER, R. 1995. Implantation: Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Human Reproduction*, 10, 2427-2431.
- GOUGE, R. C., MARSHBURN, P., GORDON, B. E., NUNLEY, W. & HUET-HUDSON, Y. M. 1998. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod*, 58, 875-9.
- HARDY, K. 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod*, 3, 919-25.
- HARDY, K., SPANOS, S., BECKER, D., IANNELLI, P., WINSTON, R. M. & STARK, J. 2001. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1655-60.
- HARDY, K., STARK, J. & WINSTON, R. M. 2003. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol Reprod*, 68, 1165-9.
- HARTSHORNE, G. 2000. The embryo. *Hum Reprod*, 15 Suppl 4, 31-41.
- HERRERO, J. & MESEGUER, M. 2013. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril*, 99, 1030-4.
- HNIDA, C., ENGENHEIRO, E. & ZIEBE, S. 2004. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod*, 19, 288-93.
- IGOSHEVA, N., ABRAMOV, A. Y., POSTON, L., ECKERT, J. J., FLEMING, T. P., DUCHEN, M. R. & MCCONNELL, J. 2010. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One*, 5, e10074.
- JANA, S. K., K. N. B., CHATTOPADHYAY, R., CHAKRAVARTY, B. & CHAUDHURY, K. 2010. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol*, 29, 447-51.
- JANSEN, R. P. & DE BOER, K. 1998. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol*, 145, 81-8.
- JOHANSSON, M., HARDARSON, T. & LUNDIN, K. 2003. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet*, 20, 309-13.
- JURISICOVA, A. & ACTON, B. M. 2004. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*, 128, 281-91.
- JURISICOVA, A., VARMUZA, S. & CASPER, R. F. 1996. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod*, 2, 93-8.
- KAMEL, R. M. 2013. Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *J Reprod Infertil*, 14, 96-109.
- LAWRENCE, E. & MANDATO, C. 2013. Mitochondrial inheritance is mediated by microtubules in mammalian cell division. *Commun Integr Biol*, 6, e27557.

- LEESE, H. J., CONAGHAN, J., MARTIN, K. L. & HARDY, K. 1993. Early human embryo metabolism. *Bioessays*, 15, 259-64.
- LEVIN, M. 2013. Reprogramming cells and tissue patterning via bioelectrical pathways: molecular mechanisms and biomedical opportunities. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 5, 657-76.
- LYAMZAEV, K. G., NEPRYAKHINA, O. K., SAPRUNOVA, V. B., BAKEEVA, L. E., PLETJUSHKINA, O. Y., CHERNYAK, B. V. & SKULACHEV, V. P. 2008. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 817-25.
- MAGLI, M. C., GIANAROLI, L., FERRARETTI, A. P., LAPPI, M., RUBERTI, A. & FARFALLI, V. 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril*, 87, 534-41.
- MANSER, R. C. & HOUGHTON, F. D. 2006. Ca²⁺-linked upregulation and mitochondrial production of nitric oxide in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Sci*, 119, 2048-55.
- MARTINO, N. A., DELL'AQUILA, M. E., CARDONE, R. A., SOMOSKOI, B., LACALANDRA, G. M. & CSEH, S. 2013. Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 27.
- MIO, Y. & MAEDA, K. 2008. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol*, 199, 660 e1-5.
- MUNNE, S. 2006. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online*, 12, 234-53.
- NAGY, Z. P., VARGHESE, A. C. & AGARWAL, A. 2012. *Practical manual of in vitro fertilization : advanced methods and novel devices*, New York, Springer.
- NAZEMIAN, Z., ESFANDIARI, N., JAVED, M. & CASPER, R. F. 2011. The effect of age on in vitro fertilization outcome: is too young possible? *J Assist Reprod Genet*, 28, 101-6.
- NEGANOVA, I. E., SEKIRINA, G. G. & EICHENLAUB-RITTER, U. 2000. Surface-expressed E-cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by aggregation. *Mol Hum Reprod*, 6, 454-64.
- NG, M. M., CHANG, F. & BURGESS, D. R. 2005. Movement of membrane domains and requirement of membrane signaling molecules for cytokinesis. *Dev Cell*, 9, 781-90.
- OTASEVIC V, SURLAN L, VUCETIC M, TULIC I, BUZADZIC B, STANCIC A, JANKOVIC A, VELICKOVIC K, GOLIC I, MARKELIC M, KORAC A, KORAC B 2014. Different expression patterns of mitochondrial OXPHOS components and mitofusin 1/dynamin related protein 1 is associated with human embryo fragmentation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 26, in press.
- PAGLIARINI, D. J. & DIXON, J. E. 2006. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci*, 31, 26-34.
- PALMER, C. S., OSELLAME, L. D., STOJANOVSKI, D. & RYAN, M. T. 2011. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal*, 23, 1534-45.

- PANKOTAI, E., CELENYAK, A., RATOSI, O., LORINCZ, J., KISS, L. & LACZA, Z. 2012. The role of mitochondria in direct cell-to-cell connection dependent rescue of postischemic cardiomyoblasts. *Mitochondrion*, 12, 352-6.
- POPP, F. A., LI, K. H. & GU, Q. 1992. *Recent advances in biophoton research and its applications*, Singapore ; River Edge, N.J., World Scientific.
- RAMALHO-SANTOS, J., VARUM, S., AMARAL, S., MOTA, P. C., SOUSA, A. P. & AMARAL, A. 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*, 15, 553-72.
- RIVERA, R. M., KELLEY, K. L., ERDOS, G. W. & HANSEN, P. J. 2003. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biol Reprod*, 69, 2068-77.
- RIZZUTO, R., DUCHEN, M. R. & POZZAN, T. 2004. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci STKE*, 2004, re1.
- ROMAGNOLI, A., AGUIARI, P., DE STEFANI, D., LEO, S., MARCHI, S., RIMESSI, A., ZECCHINI, E., PINTON, P. & RIZZUTO, R. 2007. Endoplasmic reticulum/mitochondria calcium cross-talk. *Novartis Found Symp*, 287, 122-31; discussion 131-9.
- SAKKAS, D. 2014. Embryo selection using metabolomics. *Methods Mol Biol*, 1154, 533-40.
- SATHANANTHAN, A. H. 2013. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: a personal survey. *Micron*, 44, 1-20.
- SCHATTEN, H. 2004. *Germ cell protocols*, Totowa, N.J., Humana Press.
- SHEN, S., ROSEN, M. P., DOBSON, A. T., MCCULLOCH, C. E., RINAUDO, P. & CEDARS, M. I. 2005. While Day 3 Embryo Fragmentation Significantly Impacts Implantation, it Has No Impact on Clinical Pregnancy Loss. *Fertil Steril*, 84, S290-S291.
- SHENG, Z. H. & CAI, Q. 2012. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 13, 77-93.
- SHERIDAN, C. & MARTIN, S. J. 2010. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion*, 10, 640-8.
- SKULACHEV, V. P. 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*, 11, 473-85.
- STEER, C. V., MILLS, C. L., TAN, S. L., CAMPBELL, S. & EDWARDS, R. G. 1992. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod*, 7, 117-9.
- TOLKOVSKY, A. M. 2009. Mitophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1508-15.
- ULIVIERI, C. 2010. Cell death: insights into the ultrastructure of mitochondria. *Tissue Cell*, 42, 339-47.
- VAN BLERKOM, J. 2004. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, 128, 269-80.
- VAN BLERKOM, J., DAVIS, P. & ALEXANDER, S. 2000. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod*, 15, 2621-33.

- VAN BLERKOM, J., DAVIS, P. & ALEXANDER, S. 2001. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod*, 16, 719-29.
- VEECK, L. L. & XENAKIS, T. 1986. *Atlas of the human oocyte and early conceptus. Volume 2*, Baltimore ; London, Williams & Wilkins.
- VERGOUW, C. G., AL NOFAL, M., KOSTELIJK, E. H., ROTH, H., HOMPES, P. G., SCHAT, R. & LAMBALK, C. B. 2013. The association of the blastomere volume index (BVI), the blastomere symmetry index (BSI) and the mean ovality (MO) with ongoing implantation after single embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*, 30, 587-92.
- WAI, T., AO, A., ZHANG, X., CYR, D., DUFORT, D. & SHOUBRIDGE, E. A. 2010. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod*, 83, 52-62.
- WANG, L. Y., WANG, D. H., ZOU, X. Y. & XU, C. M. 2009. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10, 483-92.
- WILDING, M., DALE, B., MARINO, M., DI MATTEO, L., ALVIGGI, C., PISATURO, M. L., LOMBARDI, L. & DE PLACIDO, G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 16, 909-17.
- XIA, P. 1997. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*, 12, 1750-5.
- YAMSKOVA, V. P., KRASNOV, M. S. & YAMSKOV, I. A. 2010. On mechanisms underlying regeneration and repair processes in tissues. *Bull Exp Biol Med*, 149, 140-3.
- YANG, Z., ZHANG, J., SALEM, S. A., LIU, X., KUANG, Y., SALEM, R. D. & LIU, J. 2014. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC Med Genomics*, 7, 38.

BIOGRAFIJA AUTORA

Lela Šurlan je rođena 11. aprila 1971., Bosanskom Novom, SFRJ.

Završila je Srednju matematičko-fizičko-računarsku školu, programerskog smera u Pucarevu, 1989.godine. Upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu 1989/90 godine na smeru Biologija, uže usmerenje Citologija, histologija i embriologija. Diplomirala je 2000.godine u okviru izborne oblasti Embriologija sa opštim uspehom 8,63 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Magistarske studije upisala je 2001.godine na Biološkom fakultetu, na studijskom programu Citologija, sa kojih je 2007. upisala Doktorske studije na Biološkom Fakultetu na programu Biologija, modul Biologija ćelije.

Radila je kao biolog - pripravnik, a potom kao istraživač - saradnik, u Specijalnoj bolnici „Beograd“, na projektu derivacije embrionalnih matičnih ćelija, od 2003. - 2006. godine. U Klinici za ginekologiju i akušerstvo KCS, zaposlena je od 2007., na poziciji biologa - embriologa, gde se usavršila u tehnikama biomedicinski potpomognutog opođenja (BMPO) i uradila eksperimentalni deo doktorske teze.

Međunarodnu potvrdu stručnosti za kliničkog embriologa /Clinical Ebryologist Certificate/ stekla je 2010.godine u Stokholmu, nakon sticanja uslova i polaganja završnog ispita pri European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Učestvovala je na IPA Adriatic CBC Programe: Future Medicine, Establishment of the First Level Stem Cell Laboratories, od 2011. -2013. godine.

Član je Republičke stručne komisije za BMPO pri Ministarstvu zdravlja Republike Srbije. Član je Evropskog udruženja za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE). Izabrana je za predstavnika Srbije u ESHRE Committee of National Representatives (CNR), za "basic scientist" kategoriju u mandatu od 2015.-2017.godine.

Osnivač je i Predsednik UO Udruženja srpskih embriologa (USE).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Лела Р. Шурлан

број индекса _____ В0 060201

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације

преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 28.06.2014

Lela Suran

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Лела Р. Шурлан

Број индекса В0 060201

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада „Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације
преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића“

Ментори др Александра Кораћ, редовни професор,

Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Иван Тулић, редовни професор,

Медицински факултет, Универзитет у Београду

Потписана: Лела Р. Шурлан

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 28.06.2014.

Lela Šurčan

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 28.08.2014.

