



Vilniaus
universitetas

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Neurobiologijos ir biofizikos katedra

Biofizikos studijų programos II kurso studentas

Povilas Maldūnas

Magistro baigiamasis darbas

**Metų laikų, meteorologinių parametrų ir mėnulio fazės įtaka
kiaušialastės skaidriojo dangalo (*zona pellucida*) storiui ir pagalbinio
apvaisinimo procedūrų sėkmei**

Darbo vadovė:

m. dr. Živilė Gudlevičienė

VILNIUS 2021

**Metų laikų, meteorologinių parametrų ir mėnulio fazės įtaka
kiaušialąstės skaidriojo dangalo (*zona pellucida*) storiui ir pagalbinio
apvaisinimo procedūrų sėkmei**

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Santaros vaisingumo centre (SVC)

Povilas Maldūnas

Darbo vadovė:

m. dr. Ž. Gudlevičienė

TURINYS

| | |
|--|----|
| ĮVADAS..... | 5 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA..... | 7 |
| 1.1. Moters reprodukcinė sistema | 7 |
| 1.1.1. Makštis | 7 |
| 1.1.2. Gimdos kaklelis | 7 |
| 1.1.3. Gimda..... | 7 |
| 1.1.4. Kiaušintakis..... | 8 |
| 1.1.5. Kiaušidės..... | 8 |
| 1.2. Kiaušialąstės skaidrusis dangalas (<i>Zona pellucida</i>)..... | 9 |
| 1.3. ZP glikoproteinai | 11 |
| 1.4. Spindulinis vainikas (<i>corona radiata</i>)..... | 12 |
| 1.5. Spermatozoido migracija moters lytiniuose takuose | 13 |
| 1.6. Molekulės, dalyvaujančios spermatozoido ir kumulinių ląstelių sąveikoje ... | 14 |
| 1.7. Apvaisinimo procesas | 15 |
| 1.7.1. Akrosomos reakcija | 15 |
| 1.7.2. Prasiskverbimas pro plazminę membraną ir lytinių ląstelių citoplazmų susiliejimas | 17 |
| 1.8. Spermatozoido prisitvirtinimas prie skaidriojo dangalo ir sąveika su juo..... | 18 |
| 1.9. Spermatozoido ir kiaušialąstės plazminės membranos sąveika..... | 19 |
| 1.10. Pagalbinis apvaisinimas | 21 |
| 1.10.1. Klasikinis apvaisinimas mėgintuvėlyje (IVF) | 21 |
| 1.10.2. Intracitoplazminė spermatozoidų injekcija (ICSI)..... | 22 |
| 1.11. Žmogaus kiaušialąstės skaidriojo dangalo tyrimai..... | 24 |
| 1.12. Metų laikų įtaka pagalbinio apvaisinimo procedūrų efektyvumui | 26 |
| 1.13. Metų laikų įtaka natūraliam apvaisinimui ir gimstamumui..... | 28 |
| 1.14. Metų laiko reikšmė priešlaikiniam gimimui..... | 29 |
| 1.15. Sezoniškumo įtaka vyriškų lytinių ląstelių rodikliams..... | 30 |
| 1.16. Mėnulio fazių įtaka apvaisinimui ir lytinėms ląstelėms | 33 |
| 2. TYRIMO METODAI IR TIRIAMASIS OBJEKTAS..... | 35 |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS | 40 |
| 4. IŠVADOS..... | 65 |
| SANTRAUKA | 66 |

| | |
|---------------------------|----|
| SUMMARY | 67 |
| 5. LITERATŪRA..... | 68 |
| 6. REZULTATŪ SKLAIDA..... | 72 |

ĮVADAS

Nevaisingumas yra viena aktualiausių šiandieninio pasaulio jaunų žmonių sveikatos problemų. Specialistai nevaisingumą apibrėžia kaip subrendusio organizmo nesugebėjimą susilaukti palikuonių. Pagal Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) apibrėžimą nevaisingumas diagnozuojamas tada, kai pora turėdama aktyvius reguliarius lytinius santykius negali pastoti per vienerių metų laikotarpį. Yra paskaičiuota, jog pirminis nevaisingumas (kai moteris niekada nebuvo pastojusi) 33% atvejų išsivysto dėl tam tikrų moters sveikatos problemų. Dar 33% atveju nevaisingumo priežastimi būna įvairūs vyrų sveikatos sutrikimai, 15% - dėl abiejų partnerių, o likę 19% - dėl nenustatytų priežasčių. 2015 metų duomenimis, pasaulyje buvo 48,5 milijonai porų, kurios negali susilaukti vaikų. Taip pat buvo apskaičiuota, jog 1,9% pasaulio moterų, kurių amžius yra nuo 20 iki 44 metų, negalėjo susilaukti savo pirmagimio. Efektyviausiai nevaisingumo problemos yra gydomos taikant pagalbinio apvaisinimo procedūras.

Apvaisinimas yra iš daugelio žingsnių susidedantis procesas ir tuos žingsnius žengti organizmas turi būti nuolatos pasiruošęs. Mokslininkams ir gydytojams, dirbantiems su nevaisingomis poromis, dažnai iškyla klausimų, nuo ko gali priklausyti poros nevaisingumas, prasta embrionų kokybė, mažas kiaušialąsčių apvaisinimo dažnis ar nepastojimas. Taip pat neatmetama galimybė, jog skirtingas metų laikas bei meteorologiniai parametrai gali turėti didesnės ar mažesnės, teigiamos ar neigiamos įtakos pagalbinio apvaisinimo procedūroms ir poros vaisingumui bendrai.

Darbo tikslas: nustatyti metų laikų, meteorologinių parametų ir mėnulio fazės įtaką kiaušialąstės skaidriojo dangalo storiui, lytinių ląstelių kokybei ir kiaušialąsčių apvaisinimui.

Darbo uždaviniai:

1. Analizuojant kiaušialąsčių nuotraukas, išmatuoti pagalbinio apvaisinimo procedūroms gautų ir apvaisintų kiaušialąsčių skaidriojo dangalo (ZP) storį;
2. Iš pagalbinio apvaisinimo registro surinkti duomenis apie pagalbinio apvaisinimo procedūrų atlikimo laiką, jų tipą ir kiaušialąsčių apvaisinimo pobūdį.
3. Iš Lietuvos hidrometeorologijos tarnybos gauti duomenis apie kritulių kiekį, saulės švietimo valandas, temperatūrą ir mėnulio fazę pagalbinio apvaisinimo metu;

4. Naudojant statistinės analizės metodus, įvertinti minėtų parametrų, sąsajas su kiaušialąsčių skaidriojo dangalo storiu, lytinių ląstelių kokybe bei apsivaisinimo pobūdžiu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Moters reprodukcinė sistema

1.1.1. Makštis

Makštis (angl. *vagina*) yra vienas iš vidurinių neporinių moters lytinių organų, kuris prasideda išorėje ir tęsiasi iki gimdos kaklelio. Suaugusios moters makšties ilgis siekia 8-10 cm. Ši dalis svarbi lytiniam aktui, o baigiantis nėštumui tampa gimdymo kanalu, pro kurį vaisius natūralaus gimdymo metu atkeliauja į išorinį pasaulį. Makštis yra moters reprodukcinės sistemos vieta, į kurią lytinio akto metu patalpinama varpa. Vėliau, sperma su joje esančiais spermatozoidais ejakuliacijos metu paleidžiama, todėl įvardijama, jog ši moters kūno dalis duoda pradžią potencialiam spermatozoido ir kiaušialąstės susijungimui – apvaisinimui (Marieb, 2004, 1084-1085p.).

1.1.2. Gimdos kaklelis

Gimdos kaklelis (angl. *cervix*) yra moters reprodukcinės sistemos dalis, kuriuo gimda jungiasi su viršutine makšties dalimi. Jis sudaro apie trečdalį gimdos aukščio (3 cm). Gimdos kaklelis yra cilindro/kūgio formos ir išsikiša virš priekinės viršutinės makšties sienelės, o jo forma keičiasi nėštumo metu. Šis organas yra išklotas 3-5 mm. storio gleivine nelygiu, raukšlėtu paviršiumi. Gleivinės paviršių dengiantis vienasluoksnis stulpelinis epitelis išskiria skystį, kuris uždaro kaklelio kanalą, taip neleisdamas patekti bakterijoms iš makšties. Gimdos kaklelis taip pat turi būti įveiktas, jeigu spermatozoidas nori pasiekti ir apvaisinti kiaušialąstę. Gimdos kaklelis yra naudojamas ir kaip vieta vykdyti kontracepcijai: gimdos kaklelio taurelės (angl. *cervical caps*) ar diafragmos (angl. *cervical diaphragms*) yra patalpinamos į gimdos kaklelį, taip užblokuojamas kelias spermatozoidui keliauti toliau ir pasiekti kiaušialąstę. Vykstant įprastam gimdymui, gimdos kaklelis, kaip ir makštis, išplatėja, taip atidarydamas vaisiaus gimimo kanalą (angl. *birth canal*) (Marieb, 2004, 1083p.).

1.1.3. Gimda

Gimda (angl. *uterus*) įvardijamas kaip pagrindinis moters vidinis lytinis – reprodukcinis organas, į kurio sienelę įsitvirtina apvaisinta kiaušialąstė ir bręsta vaisius. Ji yra kriaušės formos raumeninis organas mažajame dubenyje, tarp tiesiosios žarnos ir šlapimo pūslės, maždaug 7,6 cm ilgio, 4,5 cm pločio bei 3 cm storio. Vidutiniškai, suaugusios moters gimda sveria apie 60 gramų. Viršutinė, pusapvalė gimdos dalis yra vadinama gimdos dugnu, žemiau jos yra

didžiausia dalis – gimdos kūnas, kuris einant į apačią siaurėja ir pereina į gimdos sąsmauką, kuri jungiasi su gimdos kakleliu. Gimda atlieka apsauginę nuo mechaninių jėgų, maisto medžiagų tiekimo ir susidariusių produktų šalinimo funkcijas, kurie susidaro embriono (1-8 savaitės) ir vaisiaus (nuo 9 savaitės iki gimdymo) vystymosi metu. Gimdymo metu raumeninė gimdos sienelė yra svarbi stumiant vaisių link išorės. Gimdos sienelę sudaro trys sluoksniai: endometriumas, miometriumas ir perimetriumas. Pagrindinė gimdos, kaip antrinio lytinio organo, funkcija yra priimti apvaisintą kiaušialąstę, kuri iki implantacijos tampa blastocista, ir leisti jai implantuotis į endometriumą. Endometriumas implantacijos metu būna išvešėjęs bei pasiruošęs maitinti apvaisintą kiaušialąstę (Marieb, 2004, 1083p.).

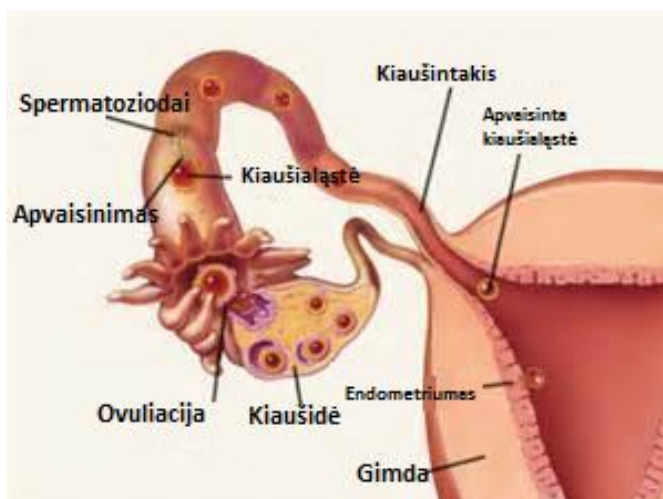
1.1.4. Kiaušintakis

Kiaušintakis (angl. *fallopian tube*), dar vadinami Falopijaus vamzdeliu, yra poriniai moters vidiniai lytiniai latakai, kurie jungia kiaušides ir gimdą. Šios struktūros ilgis yra vidutiniškai 10-15 cm, o skersmuo – apie 5 mm. Arčiau gimdos jis siauresnis, prie kiaušidžių – platesnis. Subrendus kiaušialąstei, folikulo ir kiaušidės sienelė plyšta, ir tokiu būdu kiaušialąstė patenka į kiaušintakį. Kiaušialąstei judėti link gimdos padeda blakstienėlių (angl. *cilia*), kurios iškloja visą vidinį kiaušintakio paviršių, judesiai. Kiaušialąstei įveikti kiaušintakį užtrunka apie 5 dienas. Jeigu moters lytinė ląstelė šios kelionės metu yra apvaisinama spermatozoido, tuomet 6 dieną ji gali sėkmingai implantuotis į gimdos endometriumą ir yra laikoma, jog moteris pastojo. Kadangi kiaušintakiu keliauja spermatozoidai, siekiantys apvaisinti kiaušialąstę, kiaušintakio aplinka yra tinkama abiem lytinėms ląstelėms. Kiaušintakis yra sudarytas iš trijų dalių: sąsmauka (angl. *isthmus*), jungianti gimdą su likusiu kiaušintakiu, ampulė (angl. *ampulla*) (vidurinė ir didžiausia kiaušintakio dalis, būtent joje dažniausiai ir įvyksta apvaisinimas) ir piltuvėlis (angl. *infundibulum*), kuris prasideda iškart prie kiaušidžių. Taip pat kiaušintakyje naujai susidariusi diploidinė ląstelė (zigota), keliaudama gimdos link, pasidalina kelis kartus ir virsta blastocista. Šios „kelionės“ sėkmė yra kritiškai svarbi užsimezgant naujai gyvybei. Jeigu kiaušintakiai netinkamai išsivystę ar pažeisti, apvaisinta kiaušialąstė judėdama link gimdos gali sustoti, kas vėliau vystosi į pavojingą moters gyvybei būklę – negimdinį nėštumą. (Marieb, 2004, 1080-1081p.).

1.1.5. Kiaušidės

Kiaušidės (angl. *ovary*) yra mažas, porinis moters lytinis organas (kartu ir endokrininė liauka), esantis netoli pilvinės erdvės ir gaubiama papilvės. Jos yra maždaug 4 cm x 3 cm x 2 cm dydžio ir sveria 10-15 g (po menopauzės svoris sumažėja beveik dvigubai iki 7-8 g), o forma primena migdolus. Pagrindinė kiaušidžių funkcija yra subrandinti kiaušialąstę bei sekretuoti

lytinius moters hormonus, kurie yra svarbūs antrinių lytinių požymių vystymuisi, menstruaciniam ciklui bei vaisingumui. Procesas, kurio metu subrendusi kiaušialąstė palieka kiaušidės, yra vadinamas ovuliacija (angl. *ovulation*) (pav. 1.1.5.). Ovuliacijos metu viena iš kiaušidžių išleidžia kiaušialąstę. Ilgai buvo manoma, jog kiaušidės subrandina po kiaušialąstę pamainomis kas du mėnesius, tačiau neseniai buvo įrodyta, jog kiaušialąsčių brandimas yra atsitiktinis. Pašalinus vieną kiaušidę, likusioji subrandindavo kiaušialąstę kiekvieną mėnesį (Marieb, 2004, 1079-1080p.).

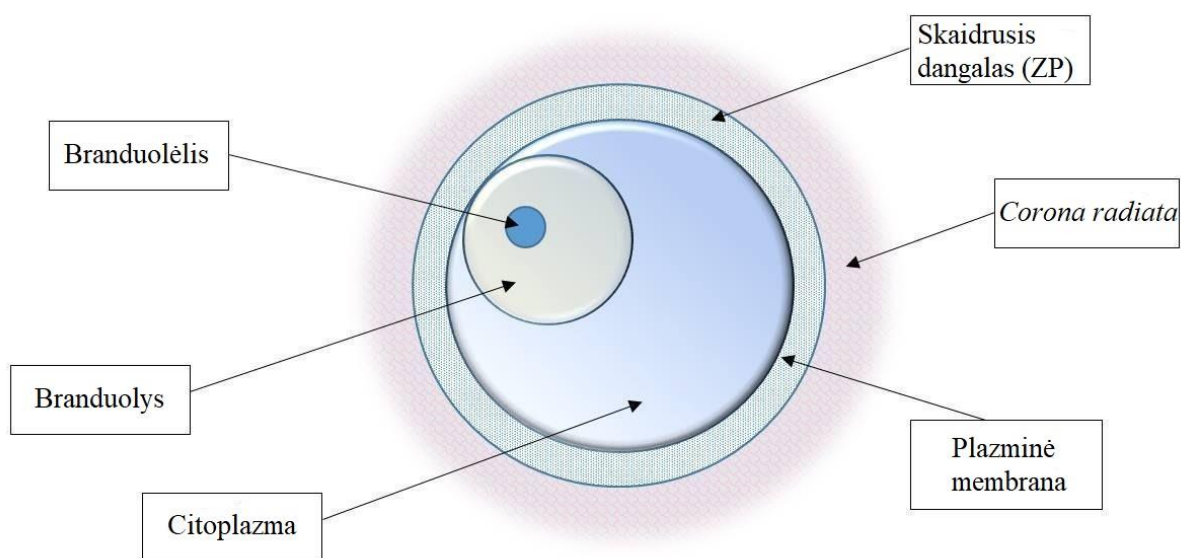


Pav. 1.1.5. Moters reprodukcinė sistema ir jos dalys. Kiaušialąstės brandimo, apvaisinimo ir kelio į gimdą schema (adaptuota pagal: <https://www.ovulationcalculator.com/ovulation>).

1.2. Kiaušialąstės skaidrusis dangalas (*Zona pellucida*)

Išvertus iš lotynų kalbos *zona pellucida* (ZP) reiškia permatomą, skaidrią zoną. Lietuviškai šis darinys vadinamas skaidriuoju dangalu. Tai yra specializuota, ekstra ląstelinė matrica, supanti besivystančią kiaušialąstę folikulo formavimosi metu ir po apvaisinimo embrionui toliau vystantis gimdoje (pav. 1.2.). Yra žinoma, kad šis plonas ZP susiformuoja iš kiaušialąstės ir folikulo granuliacinių (lot. *granulosa*) ląstelių. ZP yra kritiškai svarbus daugeliui skirtingų funkcijų, įskaitant tokias, kaip sėkmingas kiaušialąstės vystymasis, jos apsauga augant ir slenkant link gimdos. Šis sluoksnis taip pat yra svarbus spermatozoido prisijungimo procese apvaisinimo metu, siekiant apsaugoti kiaušialąstę nuo polispermijos (apvaisinimo metu į vieną kiaušialąstę patenka daugiau nei vienas spermatozoidas), formuojantis blastocistai ir apsaugant nuo priešlaikinio embriono implantavimosi arba negimdinio nėštumo (kai apvaisintos kiaušialąstės implantacija įvyksta kiaušintakyje, o ne gimdoje). Yra išsiaiškinta, kad žmonių kiaušialąstės ZP sudaro keturi skirtingi glikoproteinai

ZP1, ZP2, ZP3 ir ZP4 (pastarasis aptinkamas tik žmonių kiaušialąstėse), kurie apvaisinimo metu atlieka atskiras funkcijas (Sousa et al., 2013). Signalų perdavimo bei medžiagų mainų tarp kiaušialąstės, embriono ir supančios aplinkos užtikrina unikali ZP sandara. Net menkiausi ZP struktūriniai ir funkciniai pakitimai turi įtakos kiaušialąstės kokybei ir dėl to gali neįvykti jos apvaisinimas. Net ir po sėkmingo apvaisinimo ZP, struktūriniai pakitimai gali pakenkti tolesniam embriono vystymuisi. Taip pat svarbu paminėti, kad, priklausomai nuo tiriamosios individo rūšies bei tyrimo pobūdžio, ZP gali būti vadinamas viteline membrana, oolema ar kiaušinėlio dangalu.



Pav. 1.2. Kiaušialąstės sandara (adaptuota pagal: <https://www.slideshare.net/MaiMora/les/m-f-reproduction>).

Yra ištyrinėti įvairūs ZP struktūriniai ir funkciniai parametrai ir jų įtaka kiaušialąstei bei jos apvaisinimui. 2007 metais atlikto tyrimo metu nustatyta, jog ZP tamsumas (angl. *darkness*) neturi įtakos kiaušialąstės apvaisinimo dažniui, embriono implantacijos sėkmei bei embriono kokybei (Ten et al., 2007). Kiaušialąstės ZP tamsumas taip pat neturi įtakos blastocistos formavimuisi ir embriono išgyvenamumui užšaldymo procedūros metu (Balaban et al., 2008). Koreliacija nerasta ir tiriant ZP tamsumo ir jo storio sąsajas (Rienzi et al., 2008). Taipogi, tame pačiame eksperimente nebuvo stebėta jokios koreliacijos tarp ZP tamsumo ir embriono vystymosi ar klinikinio nėštumo tikimybės.

Yra atlikta tyrimų, kuriuose buvo aiškinamasi, kaip kiaušialąstės ZP gebėjimas laužti šviesą (angl. *birefringence*) veikia skirtingus apvaisinimo parametrus. Vienne iš jų nustatyta, jog padidėjęs ZP vidinės dalies gebėjimas laužti šviesos spindulį didina pagalbinių apvaisinimo

technologijų efektyvumu, taip pat didina kiaušialąstės apvaisinimo dažnį ir gerina tolesnį embriono vystymąsi (Montag et al., 2008; Shen et al., 2005). Tuo tarpu šiek tiek vėliau atliktame tyrime mokslininkai gavo visiškai priešingus rezultatus. Buvo nustatyta, kad ZP gebėjimas laužti šviesą nėra susijęs su kiaušialąstės apvaisinimo dažniu ar embriono vystymosi kokybe (Madaschi et al., 2009). Šio eksperimento metu taip pat pastebėta, kad kiaušialąstės, mažiau laužiančios šviesos spindulį, dažniau buvo siejamos su persileidimu (angl. *miscarriage*), o kiaušialąstės su geresniu šviesos laužimo rodikliu pasižymėjo geresniais kitais klinikiniais parametrais.

ZP yra ne tik kaip receptorių spermatozoidams, tačiau veikia ir kaip specifinis barjeras, leidžiantis kiaušialąstę apvaisinti tik tos pačios rūšies spermatozoidui (angl. *species-specific barrier*). Pakeitus pelės ZP2 ir ZP3 baltymus homologais iš žmogaus kiaušialąstės ir gavus kombinaciją pelės ZP1, žmogaus ZP2 ir žmogaus ZP3 (angl. *mouse ZP1/human ZP2/human ZP3*) buvo siekiama nustatyti, kokias galimybes būti apvaisintai turi tokia kiaušialąstė. Nustatyta, kad būtent pelės, o ne žmogaus spermatozoidai sugebėjo jungtis ir sąveikauti su modifikuotu ZP ir tuo pačiu apvaisinti kiaušialąstę (Rankin et al., 2003). Šio eksperimento autoriai padarė išvadą, kad ne tik ZP baltymai, bet ir kartu su jais esantys oligosacharidai yra kritiškai svarbūs elementai veikiant rūšiai specifiniam barjerui.

1.3. ZP glikoproteinai

Imunocheminiai žmogaus ZP tyrimai parodė, jog šio sluoksnio baltymų raiška, formuojantis folikulams kiaušidėse, yra nevienoda. ZP1 ir ZP3 glikoproteinai yra aptinkami didžiojoje dalyje folikulų (atitinkamai 93 % ir 95 %), o štai ZP2 – tik 32 % visų folikulų (Gupta, 2015). Eksperimentai su pelėmis, kurioms buvo pašalinti genai (angl. *knockout mice*) atskleidė, jog ZP1 ir ZP2 baltymų nebuvimas nedaro įtakos kiaušialąstės apvaisinimui ir spermatozoidai sėkmingai apvaisina tokias ląsteles (Rankin, 2001). Tuo tarpu pelių, kurioms buvo sustabdyta ZP3 geno raiška, pastebėta, kad kiaušialąstėse skaidrusis dangalas iš viso nesusidarė ir kiaušialąstės apvaisintos nebuvo (Rankin et al., 1996).

ZP1 yra *zona pellucida* baltymas, sudarytas iš 638 aminorūgščių, sintetinamų kiaušialąstėje. Yra žinoma, kad šis baltymas sujungia ZP2 ir ZP3 heterodimerus ir sukuria filamentinę skaidriojo dangalo struktūrą (Green, 1997).

Kiaušialąstė taip pat sintetina ZP2 glikoproteiną, jį sudaro 745 amino rūgštys – daugiausiai iš visų keturių ZP baltymų. Manoma, kad šis elementas veikia kaip antrinis spermatozoidų receptorių, kuris prisijungia juos tik įvykus spermatozoido akrosomos

reaktyvacijai. Iškart po apvaisinimo, ZP2 yra pirminis veiksnys, saugantis kiaušialąstę nuo galimos polispermijos. ZP2 apvaisintose kiaušialąstėse transformuojasi į ZP2f, kurio pagrindinė funkcija nuo šiol yra stabdyti tolesnį spermatozoidų prisijungimą prie skaidriojo dangalo (Schultz and Kopf, 1989).

ZP3 glikoproteiną sudaro 424 kiaušialąstėje sintetamos amino rūgštys. Jis atlieka svarbų vaidmenį formuojantis ZP matricai, o apvaisinimo metu pagrindinė funkcija yra užtikrinti, kad į kiaušialąstę patektų tik tos pačios rūšies individų spermatozoidai. Neseniai atliktame tyrime buvo nustatyta, kad šis baltymas gali būti aptinkamas dviejose izoformose – ZP3A ir ZP3B. Eksperimentuojant su pelių kiaušialąstėmis pastebėta, jog ZP3 yra reikalingas germinalinių vezikulių plyšimui (angl. *germinal vesicle breakdown*) vykstant kiaušialąstės mejozei (Gao et al., 2017). Šiame tyrime taip pat nustatyta, kad ZP3 raiška iš pradžių vyksta kiaušialąstės branduolyje profazės metu, o vėliau persikelia į ZP. Jau anksčiau yra žinoma, kad pelių, kurioms pašalintas už ZP3 susidarymą atsakingas genas, kiaušialąstėse nesusiformavo ZP ir kiaušialąstės nebuvo apvaisintos (Rankin et al., 1996).

ZP4 baltymą sudaro 540 amino rūgštys, kurias sintetina kiaušialąstė. Jis taip pat labai svarbus formuojantis ZP komponentas ir kartu su ZP3 inicijuoja akrosomos jungimosi reakciją tarp spermatozoido ir kiaušialąstės. Šis baltymas taip pat yra ZP inhibitorius ir dalyvauja vykstant nuo laiko ir dozės priklausančioms (angl. *time- and dose- dependent*) reakcijoms. Svarbu paminėti, jog šis glikoproteinas yra aptinkamas žmonių, žiurkių, pelių, triušių ir kitų žinduolių ZP, bet yra manoma, kad ne visi žinduoliai turi šį baltymą savo kiaušialąsčių ZP sudėtyje (Chiu et al., 2008).

1.4. Spindulinis vainikas (*corona radiata*)

Išorinis kiaušialąstės sluoksnis, kuris jungiasi su skaidriuoju dangalu yra vadinamas *corona radiata*. Spindulinis vainikas taip pat yra ir vidinis kumulinių ląstelių (angl. *cumulus cells*) sluoksnis. Viena pagrindinių spindulinio vainiko funkcijų yra apsaugoti kiaušialąstę nuo gausybės žalingų veiksnių. Šis sluoksnis yra atsakingas už gyvybiškai svarbių baltymų transportą į lytinę ląstelę. *Corona radiata* sluoksnį sudaro folikulinės ląstelės, kurios prisitvirtina prie kiaušialąstės prieš jai paliekant folikulą ir įvykstant ovuliacijai. Šios folikulinės ląstelės atsiranda iš suragėjusių granuliacinių ląstelių (lot. *granulosa cells*) pirmose folikulo vystymosi stadijose. Skirtingoje mokslinėje literatūroje naudojami skirtingi pavadinimai. Folikulo granuliacinės ląstelės ir kumulinės ląstelės yra sinonimai ir vartojami priklausomai nuo to, kokioje padėtyje kiaušialąstės atžvilgiu yra. Pagrindinė šių ląstelių

funkcija yra lytinių hormonų, atsakingų už svarbių kiaušialąstės augimo faktorių, gamyba (Marieb, 2004, 1089-1090p.).

1.5. Spermatozoido migracija moters lytiniuose takuose

Kapatizacija (angl. *capatization*) yra procesas, kurio metu žinduolių spermatozoidai bręsta ir tampa pajėgūs apvaisinti kiaušialąstę. Šis procesas vyksta moters lytiniuose takuose po ejakuliacijos (angl. *ejaculation*). Kapatizacijos metu cholesterolis, kurio yra labai gausu spermatozoido membranoje, ir kiti steroliai yra pašalinami nuo spermatozoido paviršiaus. Tuo pat metu yra paleidžiami atpalaiduoti nekovalentiniai glikoproteinai (Yano et al., 2010). Šios spermatozoido modifikacijos spermatozoido plazminę membraną paverčia skystesne, o tai yra kritiškai svarbu tolesniuose apvaisinimo žingsniuose. Taip pat nustatyta, jog kapatizacijai svarbu geras kalcio jonų patekimas į spermatozoidą bei amino rūgščių, ypač tirozino, fosforilinimas. Šie signaliniai procesai yra siejami su spermatozoido skleidžiamais „dekapatizacijos veiksniais“ (angl. *decapitization factors*) (De Jonge, 2005).

Kad įvyktų apvaisinimas, spermatozoidai turi įveikti ilgą atstumą (atsižvelgiant į jų dydį) tam, kad patektų į vietą lytiniuose takuose, kur vyksta apvaisinimas. Natūralu, kad keliaujant spermatozoidai susiduria su gausybe barjerų, kuriuos reikia įveikti. Prieš susiduriant su kiaušialąstės apsauginiais elementais, tokiais kaip kumulinės ląstelės, ZP ir kiaušialąstės plazminė membrana, spermatozoidai turi įveikti tris fizines moters lytinių takų „kliūtis“: sąsmauką (angl. *isthmus*), ampulę (angl. *ampulla*) ir gimdos kaklelio jungtį (angl. *uterotubal junction* (UTJ)). Gimdos kaklelio jungtis sujungia gimdą ir kiaušintakį, sudarydama distalinį kiaušintakio galą. Iš pradžių manyta, kad migracijos procesas labiausiai priklauso nuo to, kaip mechaniškai gerai sugeba judėti spermatozoidas, tačiau vėliau mokslininkai parodė, jog migracija yra reguliuojama molekuliniam lygyje. Dauguma spermatozoido migraciją lemiančių veiksnių buvo nustatyta atliekant eksperimentus su pelėmis, kurioms buvo pašalintas specifinis genas. Manoma, kad cisteinu turtingas katijoninis polipeptidas defensinas β 126 (angl. *defensin β 126*, DEFB126) padengia spermatozoido paviršių ir jo turimas neigiamas krūvis leidžia spermatozoidui tvirtintis prie kiaušintakio epitelio, o tai palengvina prasiskverbimą pro gimdos kaklelio gleivinę (angl. *cervical mucus*) (Tollner et al., 2008). Atlikus eksperimentus išsiaiškinta, kad pelių patinėlių spermatozoidai, neturėję vienos iš reguliacinių molekulių (kalmeginas, spermatozoido disintegrino ir metaloproteinazės kompleksas (angl. *sperm a disintegrin and metalloproteinases*, ADAMs), kurį sudaro fertinas α (ADAM1), fertinas β (ADAM2) ir cyritestinas (ADAM3) ar angiotestiną keičiantis baltymas (angl. *angiotensin-converting enzyme*, ACE)) išlaikė gebėjimą judėti, tačiau nesugebėjo

keliauti lytiniais takais (Yamaguchi et al., 2008). Metais vėliau to paties mokslininko atliktas tyrimas su pelėmis, kurioms buvo pašalintas ADAM3 ($Adam3^{-/-}$), nustatyta, jog šių pelių spermatozoidai turi problemų migruojant (Yamaguchi et al., 2009). Šiuo metu būtent ši reguliacinė molekulė yra laikoma pačia svarbiausia spermatozoidų judėjime pelių lytiniais takais.

Apvaisinimo procese sąsmauka atlieka talpyklos funkciją. UTJ įveikę spermatozoidai sąsmaukos gleivinėje gali būti iki tol, kol įvyksta ovuliacija ir tada jie juda toliau. Patekus spermatozoidams, sąsmaukos gleivinė sukuria jiems palankią terpę, kuri užvėlina kaptizacijos procesą maždaug 24 valandoms (žmonių organizmuose) (Murray and Smith, 1997). Po to, prieš prasidedant ovuliacijai, seka kol kas dar nepilnai žinomi moters lytinių takų procesai, kurie skatina spermatozoidus keliauti toliau link ampulės. Iš spermatozoido pusės, juos palikti sąsmaukos epitelį labiausiai skatina kaptizacijos metu įvykę pakitimai. To įrodymas yra eksperimentas, kuriame pastebėta, kad buliaus spermatozoidus palikti sąsmaukos epitelį skatina tai, kad jie po kaptizacijos pasikeitimų praranda savo gebėjimą sąveikauti su epiteliumi (Ignotz et al., 2001). Taip pat buvo nustatyta, kad geno, kuris koduoja CASTPER kanalą (kanalas atsakingas už kalcio jonų patekimo į vidų kontrolę), mutacijos yra viena iš galimų pagrindinių vyrų nevaisingumo priežasčių. Pastebėta, jog spermatozoidams pašalinus šį kanalą koduojantį geną ($Castper1^{-/-}$), jie nebepajėgė atitrūkti nuo epitelio ir migruoti toliau (Ho et al., 2009). Taip pat svarbu paminėti, kad šis vyriškų lytinių ląstelių migracijos moters lytiniais takais stabdymas sąsmaukoje yra veiksmingas polispermijos prevencijos mechanizmas. Po praleisto laiko sąsmaukos gleivinėje sumažėja galinčių kiaušialąstę apvaisinti spermatozoidų skaičius, kuomet dalis jų neišgyvena ir žūsta.

1.6. Molekulės, dalyvaujančios spermatozoido ir kumulinių ląstelių sąveikoje

Po to kai sėkmingai įveikia sąsmauką, spermatozoidai patenka į paskutinę lytinių takų dalį – ampulę. Ampulėje spermatozoidas aptinka kiaušialąstę atpažindamas jos kumulinių ląstelių kompleksą (angl. *cumulus oocyte complex*, COC). Buvo pastebėta, kad ši identifikacija pagrįsta chemo atraktantų atpažinimu, kuriuos sekretuoja folikuliniai skysčiai bei kumulinės ląstelės (Sun et al., 2005). Tais pačiais metais buvo nustatyta, jog olfaktorinės šeimos 1 baltymai (angl. *olfactory family 1 proteins*), esantys COC receptoriai, veikdami su chemiais atraktantais, leidžia spermatozoidams „užuosti“ COC skleidžiamus junginius (Spehr et al., 2005).

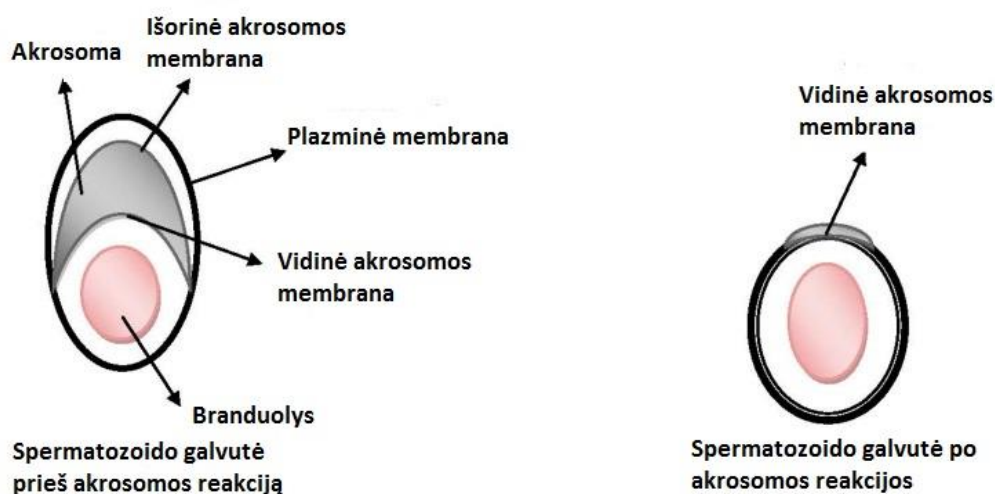
Kumulinės ląstelės taip pat yra svarbios apvaisinimo procese. Pelėms sustabdžius geno, atsakingo už kumulinių ląstelių sintezę bei stabilizaciją, raišką, sumažėjo apvaisintų kiaušialąsčių procentas (Fulop, 2003). Tuo tarpu spermatozoidas turi molekules Ph-20, Spam1 ir Hyal5, kurios sąveikauja su kumulinėmis ląstelėmis. Eksperimento metu nustatyta, jog šios molekulės atlieka svarbų vaidmenį naikinant kumulines ląsteles, kuomet spermatozoidas artėja link kiaušialąstės ZP (Kim et al., 2005). Taip pat jau yra nustatyta, kad pašalinus Ph-20 raišką pelių patinėlių organizme, jų spermatozoidai išsaugojo gebėjimą apvaisinti, tik daug mažesniu procentu nei sveikų pelių. Gavus tokius rezultatus padaryta išvada, jog sumažėjęs tokių spermatozoidų gebėjimas apvaisinti kiaušialąstę yra susijęs su sunkumais skverbiantis pro kumulinių sluoksnį paskutinėse apvaisinimo stadijose (Baba et al., 2002). Spermatozoido adhezijos molekulė 1 (angl. *sperm adhesion molecule 1*, Spam1) iš pradžių buvo traktuojama kaip spermatozoido receptorius, atsakingas už prisijungimą prie ZP, bet vėliau pastebėta, kad šis molekulė dalyvauja ir spermatozoidui prasiskverbiant pro kumulines ląsteles (Baba et al., 2002). Tyrimuose su Spam1^{-/-} pelėmis nustatyta, jog tokių pelių spermatozoidai sėkmingai tvirtinasi prie skaidriojo dangalo bei apvaisina kiaušialąstę, tačiau gebėjimas įveikti COC yra sumažėjęs. Eksperimentuose, kurie buvo atlikti su Hyal5^{-/-} pelių spermatozoidais, pastebėta, kad šių molekulių nebuvimas veikia spermatozoido prasiskverbimui pro kumulinių ląstelių kompleksą, tačiau poveikis ne toks ryškus kaip prieš tai minėtų junginių. Kaip teigia autoriai, svarbu atlikti jungtinį genų delecijos tyrimą pelių spermatozoidams, siekiant pilnai nustatyti jų įtaką apvaisinimo procesui.

1.7. Apvaisinimo procesas

1.7.1. Akrosomos reakcija

Spermatozoido akrosoma – egzocituojanti organėlė, dengianti spermatozoido galvutę. Akrosomos reakcijoje gali dalyvauti tik pilnai subrendę spermatozoidai. Pats apvaisinimo procesas prasideda tuomet, kai spermatozoidas susijungia su kiaušialąstės skaidriuoju dangalu. Tam, kad pasiektų ZP, spermatozoidas turi prasiskverbti pro kumulinių ląstelių sluoksnį. Šiuo metu yra manoma, kad kumulinės ląstelės sekretuoja cheminius atraktantus, kurių pagalba spermatozoidui yra lengviau pasiekti kiaušialąstę. Iškart po to, kai kiaušialąstė aptinkama, prasideda akrosomos reakcija. Šioje reakcijoje gali dalyvauti tik tie spermatozoidai, kurie turi nepažeistą akrosominę zoną (angl. *acrosome-intact spermatozoa*) (pav.1.7.1.). Taip pat literatūroje minima, kad būtent kumulinės ląstelės, o ne kiaušialąstės ZP, yra akrosomos reakcijos iniciatorės (Bedford et al., 2004). Minėtų ląstelių sekretuojamas progesteronas skatina pradėti akrosomos reakciją. Buvo nustatyta, kad akrosominėje reakcijoje dalyvaujančios

molekulės zonadhezinai ir sp56 atlieka svarbų vaidmenį tiek prisijungimo, tiek ir adhezijos procesuose (Muro et al., 2012). Reakcijai tinkamai subrendę spermatozoidai jungiasi ir dažniausiai sąveikauja su per deguonies atomą sujungtais (angl. *O-linked*) ZP3 oligosacharidais, kurie mokslinėje literatūroje yra įvardinti kaip atsakingi už susijungimą su spermatozoidu. Prasiskverbiant pro ZP svarbūs du spermatozoiduose aptinkami baltymai: akrosinas ir sėklidžių serino proteazė 5 (angl. *testicular serine protease 5*, TESP5) (Honda et al., 2002). Būtina pažymėti, kad pro ZP skverbiasi tik tie spermatozoidai, kurie veikė akrosomos reakcijoje (angl. *acrosome-reacted spermatozoa*) (pav. 1.6.1.), tačiau ne visi šioje reakcijoje dalyvavę spermatozoidai prasiskverbia pro ZP, nes prasiskverbęs pirmajam, idealiu atveju, susiformuoja nuo polispermijos saugantis barjeras.



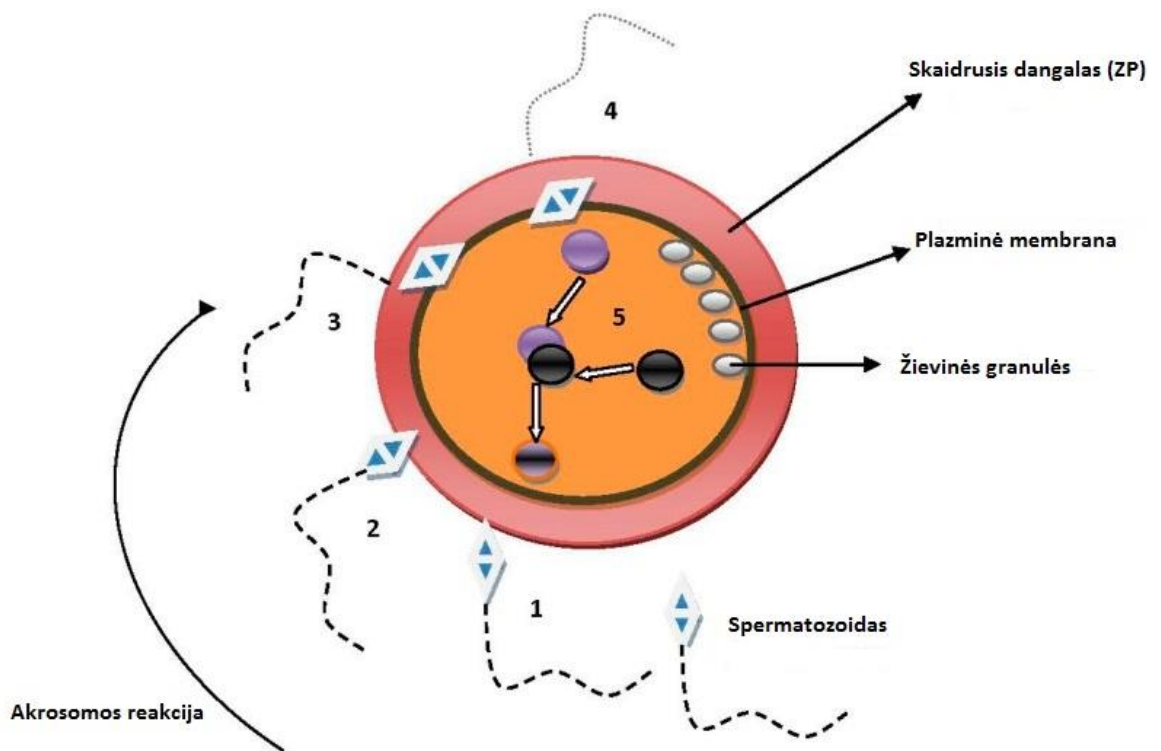
Pav. 1.7.1. Spermatozoido galvutės prieš akrosomos reakciją ir po jos palyginimas (adaptuota pagal: Anifandis et al., 2014) .

Pastaruoju metu taip pat daugėja įrodymų, jog tirpus NSF (angl. *N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*, NSF) pridėtinis baltyminis receptorių kompleksas (angl. *soluble NSF attachment protein receptor complex*, SNARE) yra vienas pagrindinių akrosomos reakcijos reguliatorių. Atliekant tyrimą su pelėmis, kurios turėjo atsitiktinę taškinę mutaciją α -SNAP koduojančiame gene (angl. *α -SNAP-encoding gene*), pastebėtas ženkliai sumažėjęs spermatozoidų gebėjimas apvaisinti kiaušialąstę (Batiz LF, et al., 2009). Kitame eksperimente su pelėmis, kurios pasižymėjo kompleksino-1 (angl. *complexin-I* (Cplx1)) stygiumi, kuris, kaip manoma, yra atsakingas už SNARE komplekso funkcionalumą, išsiaiškinta, kad tokių pelių spermatozoidai nebereaguoja į pakitusį progesterono lygį ir taip nebedalyvauja progesterono inicijuojamoje akrosomos reakcijoje (Zhao et al., 2007). Šio tyrimo metu taip pat pastebėta, jog

spermatozoidai nepraranda gebėjimo dalyvauti ligandų sukeltose (angl. *ligand-induced*) akrosomos reakcijoje, kuri nėra kertinis veiksnys akrosomos reakcijoje, tačiau prisideda prie reakcijos veiksmingumo.

1.7.2. Prasiskverbimas pro plazminę membraną ir lytinių ląstelių citoplazmų susilieėjimas

Ekvatoriaus segmentas (angl. *equatorial segment*) yra spermatozoido galvutės dalis, kuria jis jungiasi ir vėliau ištirpdo kiaušialąstės plazminę membraną. Šioje dalyje kaupiamas cisteinu turtingas sekretijos baltymas 1 (angl. *cysteine-rich secretory protein 1*, CRISP1), kuris laikomas bene svarbiausia spermatozoide veikiančia molekule, dalyvaujančia sukibime su kiaušialąstės plazmine membrana. Kiaušialąstė savo ruožtu turi adhezijos procese dalyvaujančias molekules: klasterio diferenciatorių 9 (angl. *cluster differentiation 9*, CD9) ir $\alpha 6 \beta 1$ integriną. Iškart po adhezijos, apvaisinimo procesas yra užbaigiamas, kai vietoje, gausioje mikrogaureliais, tarp spermatozoido ir kiaušialąstės susilieja branduoliai. Tyrime buvo nustatyta, kad prie šio proceso labai prisideda IZUMO1-Juno kompleksas, kuris skatina adheziją (Bianchi et al., 2014). Įvykus susilieėjimo procesui, yra inicijuojamas signalo perdavimo kelias, kuriam labai reikalingas yra Ca^{2+} jonas. Šio signalo pagrindinė funkcija yra perduoti žinią ZP ir plazminei kiaušialąstės membranai apie tai, jog jau įvyko apvaisinimas. Šis signalo perdavimas leidžia pradėti kitus procesus, kurie užtikrina polispermijos išvengimą.



Pav. 1.7.2. Apvaisinimo proceso schema. (1) Spermatozoidas, prasiskverbęs pro kumulines ląsteles, jungiasi prie ZP. (2) Spermatozoidas keliauja pro skaidrųjį dangalą. (3) Spermatozoido adhezija prie plazminės kiaušialąstės membranos. (4) Spermatozoido ir kiaušialąstės susiliejimas suformuojant du probranduolius. (5) Susijungę lytinių ląstelių probranduoliai formuoja zigotos branduolį (adaptuota pagal: Anifandis et al., 2014).

Pagrindinę funkciją apsaugant kiaušialąstę nuo polispermijos atlieka žievinės granulės (angl. *cortical granules*), esančios prie kiaušialąstės plazminės membranos vidinės pusės. Apsauginė funkcija prasideda tada, kai įvyksta šių granulių egzocitozė pro plazminę membraną (pav.1.7.2.). Dauguma mokslininkų sutinka, kad apvaisinimas yra kompleksinis procesas, bet tiksliai pasakyti, kaip vienas žingsnis tiksliai priklauso nuo kito, dar negalima. Viena to priežasčių yra eksperimentai, atliekami su milijonais spermatozoidų, kurių metu neįmanoma nustatyti, ar būtent tas spermatozoidas, kuris susijungė su skaidriu dangu ir yra tas, kuris apvaisina kiaušialąstę.

1.8. Spermatozoido prisitvirtinimas prie skaidriojo dangalo ir sąveika su juo

Po to kai įveikia kumulinių ląstelių sluoksnį, spermatozoidas susiduria su dar vienu barjeru – skaidriu dangu. Spermatozoidui sąveikaujant su šiuo dangu, svarbiausią

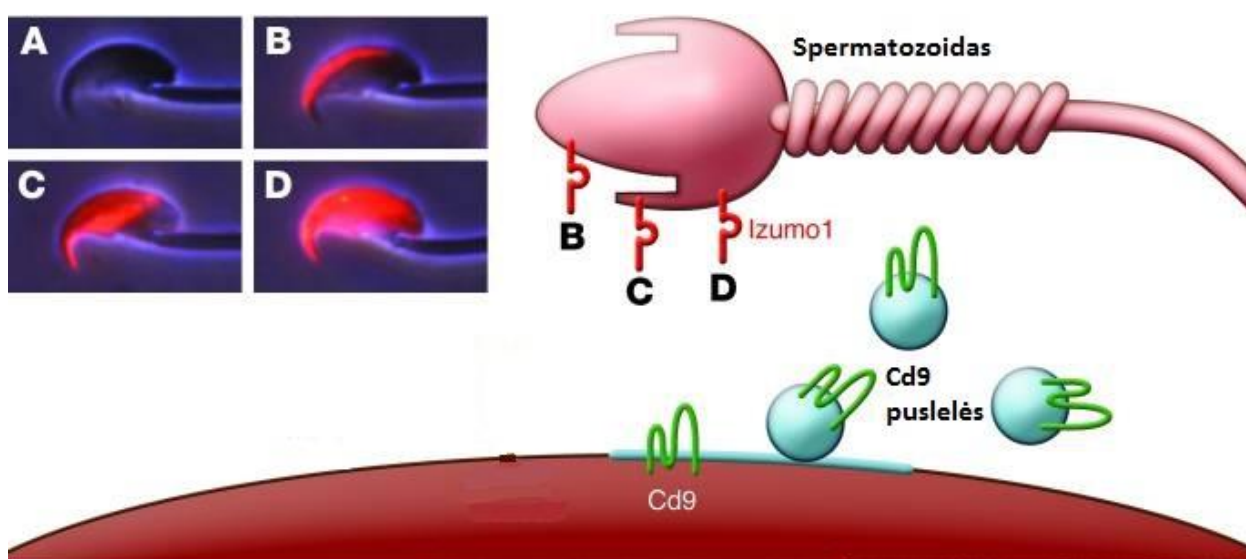
funkciją atlieka jau aprašyti ZP glikoproteinai – ZP1, ZP2 ir ZP3. Pastarasis ir yra pagrindinis ZP komponentas vykstant akrosomos reakcijai. Yra atliktas ne vienas tyrimas, kurių metu analizuota, prie kurios tiksliai ZP3 dalies prisijungia spermatozoidas. Radus ją, vietai buvo suteiktas spermatozoido prisitvirtinimo taško (angl. *sperm combining-site*) pavadinimas. Prieš tai aprašyti ADAM1, ADAM2, ADAM3, Ace genai, taip pat Clgn genas, yra svarbiausi spermatozoido komponentai, tvirtinantys prie ZP. 2006 m. atliktame moksliniame tyrime pastebėta, kad sutrikdžius Clgn geno veikimą, tai pakenkia ADAM1a/ADAM2 ir ADAM1b/ADAM2 heterodimerizacijai, ir, kadangi šie Adam šeimos baltymai tiesiogiai susiję su ADAM3 baltymo kiekiu spermatozoido membranoje, tai subrendusiuose spermatozoiduose nerandamas šis, tiesiogiai su ZP besijungiantis, baltymas (Yamaguchi et al., 2006). Šiek tiek anksčiau darytame eksperimente, kuriame pelėms buvo pašalintas ADAM1a genas, ADAM2 baltymo raiška nepakito, tačiau spermatozoide sutriko ADAM3 raiška bei jis nebegalėjo prisijungti prie ZP (Inoue et al., 2005). Visgi manoma, jog žmonių organizme yra baltymų panašių į ADAM3, nes pastebėta, jog ADAM3 homologai žmonėse yra pseudo genai.

1.9. Spermatozoido ir kiaušialąstės plazminės membranos sąveika

Sėkmingai įveikus ZP, spermatozoido kelyje toliau seka plazminė kiaušialąstės membrana. Šioje apvaisinimo stadijoje spermatozoido plazminė membrana jungiasi su kiaušialąstės plazmine membrana. Tik spermatozoidai, dalyvavę akrosomos reakcijoje (angl. *acrosome-reacted*), gali dalyvauti susijungime. Taip užtikrinama, kad susijungimui su membrana reikalingos spermatozoido molekulės nebuvo aktyvuotos prieš tai ir aktyvuojasi tik po prasiskverbimo pro skaidrųjį dangalą (t.y. po akrosomos reakcijos). Manoma, kad ši reakcija ir prasiskverbimas pro skaidrųjį dangalą inicijuoja signalų kaskadą, kuri skatina iki tol neaktyvias molekules, kurios atsakingos už susiliejamą su membrana. Klasterių diferenciacinės molekulės (angl. *Cluster differentiation (CD) molecules*) yra priskiriamos tetraspaninų super šeimai (angl. *tetraspanin superfamily*) ir dar yra vadinamos „tetraspaninų plėve“. Eksperimento metu išsiaiškinta, kad tam tikros CD molekulės, jas aktyvavus, dalyvauja membranų susiliejinimo procese (Fabryova and Simon, 2009). Vienas geriausiai žinomų CD super šeimos narių yra CD9. Yra atrasta, kad pašalinus CD9, pelių kiaušialąstės pasižymėjo mažesniu nei įprastai susiliejinimo su spermatozoidu potencialu (Jégou et al., 2011). Taip yra žinoma, jog CD9 molekulės pertvarko kiaušialąstės plazminę membraną ir padaro ją tinkamą susijungimui. Tuo tarpu kitas tyrimas parodė, jog CD9 yra sekretuojama į pūsleles kiaušialąstėje, tada gabenamos ant spermatozoido paviršiaus, tokiu būdu skatinant ląstelių susiliejamą (Simons and Raposo, 2009). Šios pūslelės yra egzosominės struktūros ir išleistos iš kiaušialąstės „bendruoja“ su

spermatozoidu, taip inicijuodamos spermatozoido-kiaušialąstės membranų susiliejimą (Kuczynski, 2002). Iš karto po reakcijos tarp spermatozoido molekulių ir CD9 egzosomų spermatozoidai jungiasi su kiaušialąstės membranos CD9 molekulėmis.

Spermatozoido molekulės IZUMO1 receptorius plazminių membranų susijungimo metu kiaušialąstėje yra Folr4 (angl. *folate receptor 4*) arba Junone (angl. *Juno*) – pavadintas Romėnų vaisingumo ir santuokos deivės garbei. Nustatyta, kad pelių patinėliai, kurie turėjo pašalintą IZUMO1 geną (IZUMO1^{-/-}) buvo visiškai sterilūs, nors jų spermatozoidai gebėjo sėkmingai prasiskverbti ir kontaktuoti su kiaušialąstės plazmine membrana (Inoue et al., 2005). Vėliau, neapvaisintoms kiaušialąstėms pritaikius intracitoplazminę spermatozoidų injekciją (angl. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) pastebėta, kad spermatozoidai apvaisina kiaušialąstę bei embrionai vystosi įprastai, juos vėliau patalpinus į patelių pelių gimdą. ICSI procedūra pasirinkta tam, jog būtų eliminuotas plazminių membranų susijungimo žingsnis. Taip buvo įsitikinta, jog IZUMO1 yra labai svarbus tiesiog lytinių ląstelių plazminių membranų susiliejime. Svarbu paminėti, kad vykstant akrosomos reakcijai, IZUMO1 migruoja iš priekinės spermatozoido galvutės dalies į šoninę, kurioje ir sulaukia susiliejimo etapo (pav.1.9).



Pav. 1.9. Spermatozoido membranos baltymo IZUMO1 migracijos iš galvutės priekio į šoną per visą paviršių modelis. (A – dar neaktyvuotas IZUMO1, B – IZUMO1 akrosominėje kepurėlėje, C – IZUMO1 ekvatoriuje, D – IZUMO1 visame spermatozoido paviršiuje) (adaptuota pagal: Ikawa et al., 2010).

2014 m. atliktame tyrime mokslininkai pastebėjo, kad pelių, su pašalintu ar prislopintu Folr4 genu, kiaušialąsčių nepavyko apvaisinti tai bandant daryti spermatozoidais, dalyvavusiais akrosomos reakcijoje (Bianchi et al., 2014). Tyrėjai padarė išvadas, jog sumažėjęs Folr4

receptorių tankis kiaušialąstės plazminėje membranoje sumažina apvaisinimo tikimybę, o kiaušialąstės, visiškai neturinčios šių receptorių, yra neapvaisinamos visiškai. Tame pačiame tyrime taip pat išsiaiškinta, jog CD9 molekulės padeda Folr4 sąveikauti su IZUMO1. Kaip teigia autoriai, ši išvada tikrai reali, nes jau ankstesnių eksperimentų metu nustatyta, kad CD9 molekulės padeda kitai nežinomai membranos molekulei sąveikauti su IZUMO1. Taip pat manoma, kad nepavykęs apvaisinimas labiau susijęs su mažu Folr4 receptorių kiekiu bei blogu pasiskirstymu ant kiaušialąstės paviršiaus nei su spermatozoido apvaisinimo potencialu.

Dar vienas tais pačiais metais atliktas tyrimas atskleidė dar vieną kiaušialąstės ir spermatozoido plazminių membranų komponentų porą, kuri sąveikauja tarpusavyje. Ją sudaro spermatozoido sincitinas-1 (angl. *syncytin-1*) ir kiaušialąstės ASCT-2 receptorių. Išsiaiškinta, kad ir šių baltymų sąveika svarbi susiliejant spermatozoido bei kiaušialąstės plazminėms membranoms (Bjerregaard et al., 2014). Svarbu pabrėžti, kad ši pora buvo rasta ne pelių, o žmonių lytinėse ląstelėse.

1.10. Pagalbinis apvaisinimas

1.10.1. Klasikinis apvaisinimas mėgintuvėlyje (IVF)

Pagalbinis apvaisinimas mėgintuvėlyje (angl. *in vitro* fertilization, IVF) yra laboratorinė pagalbinio apvaisinimo procedūra, sukurta ir pradėta taikyti prieš kiek daugiau nei 50 metų. IVF procedūra suteikia galimybę poroms, kurioms nepavyksta to padaryti natūraliu būdu, susilaukti vaikelio. Šios procedūros pagalba gauti bei laboratorijos sąlygomis auginti embrionai, pasiekus reikiamą jų subrendimo lygį, patalpinami į moters gimdą. Praėjus parai po atliktos IVF procedūros kasdien yra stebimas ir vertinamas embrionų vystymasis. Embrionai po apvaisinimo yra kultivuojami inkubatoriuje nuo dviejų iki penkių parų. Vėliau, atrinkus geriausios kokybės embrionus, jie perkeliama į moters gimdą tolesniems nėštumo etapams. Pagrindinės priežastys, kodėl taikomos IVF procedūros, yra:

- Prasta spermatozoidų kokybė ir/arba mažas jų kiekis;
- Spermatozoidui ir kiaušialąstei susilieti natūraliai trukdo tam tikri fiziniai barjerai vyro arba moters organizme;
- Ovuliacijos problemos;
- Spermatozoido ir kiaušialąstės susijungimo problemos.

Pacienčių, jaunesnių nei 35 metai, pastojimo dažnis atliekant klasikinę IVF procedūrą siekia beveik 40%. Tuo tarpu moterims, vyresnėms nei 42 metai, procedūros efektyvumas

tesiekia vos 4%. Pasitaiko ir tokių atvejų, kai IVF metu neapsivaisina nė viena kiaušialąstė. Tai nutinka 5% – 20% IVF procedūrų (Kuczynski, 2002). Atlikti tyrimai parodė, kad pagrindinė tokio neapsivaisinimo priežastis yra ta, jog spermatozoidas nesugeba prasiskverbti pro kiaušialąstės ZP iki plazminės membranos (Liu and Baker, 2000).

Pirmas kūdikis taikant IVF procedūrą gimė 1978 m., Oldhamo bendrojoje ligoninėje, Anglijoje, taikant planuotą Cezario pjūvio operaciją (<https://ivf.net/ivf/what-is-ivf-o761.html>).

1.10.2. Intracitoplazminė spermatozoidų injekcija (ICSI)

Intracitoplazminė spermatozoidų injekcija (angl. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) yra pagalbinio apvaisinimo procedūra, kurios metu vienas sveikas spermatozoidas, naudojant specialią mikro adatą, patalpinamas į subrendusios kiaušialąstės citoplazmą. Prieš atliekant šią procedūrą pirmiausia reikia pašalinti kumulinių ląstelių sluoksnį nuo kiaušialąstės. Tam yra naudojamas fermentas hialuronidazė (angl. *hyaluronidase*), kuri anksčiau buvo išskiriama iš jaučio sėklidžių, bet šiuo metu pasitelkus naujas technologijas, dažniausiai yra sintetinama. Po to nedidelis kiekis spermatozoidų yra lėkštelėje sumaišomas su tirpalu, kurio didžiąją dalį sudaro poli vinil pirolidonas (angl. *poly vinyl pyrrolidone*, PVP). Šio junginio pagrindinė funkcija yra sulėtinti spermatozoidų judėjimą ir taip leisti juos lengviau atrinkti ICSI procedūrai. Mikroskopo pagalba, atrenkami vizualiai geriausiai atrodantis spermatozoidai (turintis mažiausiai defektų) ir stikline adatėle yra pašalinama (nukertant) jo uodegėlė. Vėliau tokie „apgenėti“ spermatozoidai susiurbiami į mikro adatėlės vidų ir yra pasiruošti injekuoti į kiaušialąstę ir ją apvaisinti. Svarbu pabrėžti, kad į vieną kiaušialąstę suleidžiama tik vieno spermatozoido galvutė.

Po to, kai spermatozoidas paruošiamas, lėkštelė su kiaušialąstėmis yra padedama po mikroskopu. Su laikomąja pipete (angl. *holding pipette*) yra mobilizuojama kiaušialąstė, iš kitos pusės mikro adatėlė su paruoštu spermatozoidu įduriama į kiaušialąstės vidų iki citoplazmos. Galiausiai atlikus šią procedūrą, kiaušialąstės patalpinamos į specialią terpę kur jos, jeigu apvaisina sėkmingai ir vystosi embrionai, būna iki patalpinimo atgal į moters organizmą.

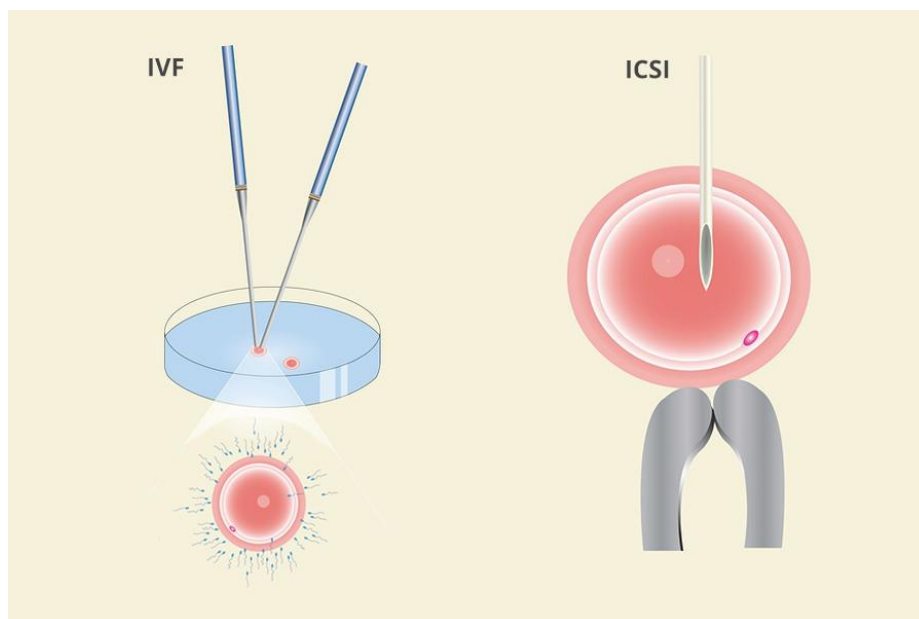
Pagrindinės priežastys, dėl kurių yra renkamosi atlikti ICSI procedūrą:

- Visiškas spermatozoidų nebuvimas ejakuliacijos metu (azoospermija);
- Maža spermatozoidų koncentracija (oligospermija);
- Ženkliai sumažėjęs spermatozoidų judrumas (astenospermija);
- Blogos spermatozoido morfologinės savybės (teratospermija);

- Spermatozoidų gavimas taikant invazines technologijas (pvz. spermatozoidų išsiurbimas iš sėklidžių (angl. *testicular sperm aspiration*, TESA), spermatozoidų ekstrakcija iš sėklidžių (angl. *testicular sperm extraction*, TESE));
- Problemos su spermatozoidų prisitvirtinimu bei prasiskverbimu pro skaidrą dangalą;
- Prieš tai nepasisekusios IVF procedūros arba mažas kiaušialąsčių apvaisinimo dažnis taikant IVF;
- Kai planuojama atlikti preimplantacinę genetinę diagnostiką (PGD);
- Kuomet yra naudojamos užšaldytos ir lytinių ląstelių banke saugotos kiaušialąstės;
- Partnerio ŽIV atveju.

Taikant ICSI metodą apvaisina 50-80 % kiaušialąsčių. Atrodytų, kad po atliktų tokių žingsnių turėtų apvaisinti didžioji dalis kiaušialąsčių, kadangi išvengiama daugybės apsauginių barjerų, tačiau taip nėra. Apvaisinimas nėra garantuotas net tuomet, kai spermatozoidai patalpinami tiesiai į kiaušialąstės citoplazmą (<https://ivf.net/ivf/icsi-intracytoplasmic-sperm-injection-o2109.html>). Embriologai kaip vieną iš nesėkmingo apvaisinimo priežasčių ICSI metu nurodo mechaninį skaidriojo dangalo pažeidimą. Tai tik dar kartelį įrodo, koks sudėtingas yra apvaisinimo procesas.

Bendrai IVF ir ICSI procedūrų efektyvumas vertinamas moterų pastojimo bei gimdymų dažniu – kiek moterų pastojo ir pagimdė po atliktų pagalbinio apvaisinimo procedūrų.



Pav. 1.10.2. IVF ir ICSI procedūrų skirtumų schema (adaptuota pagal: <https://sofatinfertility.com/news/is-icisi-better-than-ivf-icisi-vs-ivf/>).

1.11. Žmogaus kiaušialąstės skaidriojo dangalo tyrimai

Pasaulyje nuolatos atliekami tyrimai, kurių metu matuojamas kiaušialąsčių ZP storis, tačiau dažniausiai šie eksperimentai atliekami naudojant ne žmonių, o kitų žinduolių – pelių, kiaulių ar karvių – lytines ląsteles. Vienas eksperimentų, naudojant žmogaus kiaušialąstes, buvo atliktas 2016 metais Kinijoje (Shi et al., 2016). Šiame tyrime lygintos dviejų tipų kiaušialąstės: turinčios normalų ZP ir tokios, kurioms buvo identifikuoti vienokie ar kitokie morfologiniai pakitimai. Nustatyta, kad kiaušialąsčių su morfologiniais ZP pakitimais šis sluoksnis buvo statistiškai reikšmingai storesnis ($P = 0,001$) nei kiaušialąsčių, turėjusių normalų skaidrų dangalą ($14,38 \pm 1,13 \mu\text{m}$ ir $11,64 \pm 1,28 \mu\text{m}$ atitinkamai). Taip pat nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp normaliai apsivaisinusių (kai susidaro 2 pro branduoliai) kiaušialąsčių skaičių abiejose grupėse: kiaušialąstėse su normaliu ZP teisingai apsivaisina 82,5 % apsivaisinusių kiaušialąsčių, tuo tarpu antroje grupėje tik 70,7 % visų apsivaisinusių kiaušialąsčių turėjo 2 pro branduolius. Panašūs rezultatai gauti ir 2013 metais atliktame tyrime. Kiaušialąstės su morfologiniais pakitimais turėjo storesnį ZP nei normaliai morfologiškai atrodančios kiaušialąstės (Sousa et al., 2013). Matuojant šviesiniu mikroskopu, vidutiniškas storis buvo $15,4 \mu\text{m}$ morfologiškai pakitusių ir $12,3 \mu\text{m}$ nepakitusių kiaušialąsčių, o vertinant ZP storį elektroniniu mikroskopu, jis buvo atitinkamai $12 \mu\text{m}$ ir $9 \mu\text{m}$.

Dar viename panašiu metu atliktame tyrime (Song et al., 2016) buvo vertinama, kaip skiriasi kiaušialąsčių skaidriojo dangalo storiai trijose grupėse: natūraliai subrendusios, laboratorinėmis sąlygomis subrandintos bei nesubrendusios kiaušialąstės. Gauta, kad ZP sluoksnis statistiškai reikšmingai nesiskyrė visose trijose grupėse (1 grupė – $8,74 \pm 0,04 \mu\text{m}$, 2 grupė – $8,53 \pm 0,22 \mu\text{m}$ ir 3 grupė – $8,23 \pm 0,32 \mu\text{m}$). Taip pat svarbu ir tai, kad šie matavimai buvo atlikti su atšildytais kiaušialąstėmis.

2015 metais publikuotame tyrime buvo tyrinėta, kokią įtaką kiaušialąstės ZP daro žmogaus menopauzinis gonadotropinas (žMG) (angl. *human menopauzal gonadotropin*, hMG) (Bing et al., 2015). Tiriamosios buvo išskirstytos į dvi grupes: moterys, kurioms buvo taikytas gydymas tiek folikulus stimuliuojančiu hormonu (FSH), tiek ir žMG, bei moteris, kurioms buvo taikytas gydymas tik FSH. ZP storis šio eksperimento metu buvo matuotas du kartus: 6–ą ir 20–ą valandą po atliktos IVF procedūros. Gauti rezultatai parodė, kad tiek pirmojo, tiek antrojo matavimo metu, kiaušialąstės tų pacienčių, kurioms buvo atlikta tik vieno hormono terapija, turėjo statistiškai reikšmingai plonesnį ZP (atitinkamai $18,75 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ir $18,17 \pm 0,14 \mu\text{m}$) nei tų, kurioms buvo taikytas dvigubas gydymas (atitinkamai $19,20 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ir $18,69 \pm 0,12 \mu\text{m}$).

2012 metais Toronto universiteto mokslininkų atliktame tyrime aiškintasi, ar moters amžius ir hormonų lygis organizme turi įtakos kiaušialąsčių skaidriojo dangalo susidarymui (Balakier et al., 2012). Suskirstčius pacientes į tris amžiaus grupes (jaunesnės arba 35 m. amžiaus, nuo 36 m. iki 39 m. amžiaus bei 40 m. ir vyresnės), koreliacijos tarp ZP storio ir moterų amžiaus nepastebėta. Taip pat nebuvo ir statistiškai reikšmingo skirtumo tarp estrogeno kiekio moters organizme ir kiaušialąstės ZP storio. Identiški rezultatai gauti ir tyrinėjant sąsajas tarp ZP storio bei FSH koncentracijos moters organizme. Galiausiai, nepavyko nustatyti jokių sąsajų tarp ZP storio ir į moters organizmą patalpintų embrionų implantacijos dažnio.

2004 metų tyrime, kur buvo stebėta rūkymo įtaka kiaušialąsčių kokybei, nustatyta, kad rūkymas turi įtakos kiaušialąstės ZP storiui (Shiloh, 2004). Eksperimento metu buvo sukurtos keturios grupės: rūkančios moterys, abu rūkantys partneriai, rūko tik vyras ir abu nerūkantys partneriai. ZP storiai buvo matuoti kiaušialąstėms prieš apvaisinimą ir 2 parų embrionams (0–ę ir 48–ą valandą). Rezultatai parodė, kad porų, kuriose abu partneriai nerūkė, tiek kiaušialąsčių, tiek ir embrionų ZP storiai buvo žymiai mažesni lyginant su visomis kitomis grupėmis (pvz. nerūkančios poros ZP storis 0–ę valandą buvo $15,32 \mu\text{m}$, o grupės, kurioje rūko abu – $20,11 \mu\text{m}$). Tuo tarpu lyginant, kaip pasikeitė ZP storis vystantis embrionui, rasta, jog didžiausias ZP suplonėjimas yra grupėje, kurioje abu partneriai rūkė ($1,24 \mu\text{m}$). Taip pat šiek tiek mažiau ZP storis sumažėjo grupėje, kurioje rūkė tik moterys ($0,82 \mu\text{m}$), o grupėse kur rūkė tik vyras ir

kuriose abu partneriai nerūkė ZP storių sumažėjimas buvo minimalus (atitinkamai 0,10 μm ir 0,21 μm).

Svarbu paminėti, kad rasti mokslinių straipsnių, kuriuose būtų aprašyti tyrimai, analizuojantys žmonių kiaušialąsčių ZP storio priklausomybę nuo sezoniškumo, mėnulio fazės ar meteorologinių parametrų, nepavyko. Buvo rastas tik vienas tyrimas su pelių kiaušialąstėmis, tačiau gautieji rezultatai ir išvados buvo neaiškios.

1.12. Metų laikų įtaka pagalbinio apvaisinimo procedūrų efektyvumui

2019 m. bendrame Kinijos ir Australijos mokslininkų tyrime (Liu et al., 2019) panaudojant dar didesnę imtį taip pat buvo aiškinamasi, ar pagalbinio apvaisinimo procedūrų atlikimas įvairiais metų laikais turi įtakos jų efektyvumui. Imtį sudarė 26 602 procedūros, iš kurių 13 223 buvo atliktos su šviežiais embrionais, o 13 379 – su atšildytais embrionais. Nustatyta, jog nevaisingumo pobūdis statistiškai reikšmingai nekoreliavo skirtingais metų laikais. Statistiškai reikšmingo skirtumo taip pat nenustatyta ir stebint klinikinio pastojimo dažnį. Stebint gautų kiaušialąsčių skaičių pagalbinio apvaisinimo procedūros metu ir patalpintų embrionų skaičių taip pat nenustatyta jokių statistiškai reikšmingų skirtumų tarp sezonų. Tuo tarpu gonadotropino išskyrimo kiekis ir trukmė didžiausi buvo rudenį ir reikšmingai skyrėsi lyginant su kitais metų laikais. Be to, geros kokybės embrionų skaičius didžiausias buvo žiemos ir pavasario laikotarpiais ir reikšmingai skyrėsi lyginant su kitais metų laikais. Tyrėjai taip pat apskaičiavo, jog vyrų lytinėms ląstelėms sezonai įtakos turi – jų spermatozoidų koncentracija statistiškai reikšmingai skyrėsi skirtingais metų laikais ir didžiausia vertė buvo fiksuojama rudenį.

2018 m. Izraelyje atliktame tyrime (Kirshenbaum et al., 2018) mokslininkai nustatė, jog sezoniškumas neturi įtakos pagalbinio apvaisinimo procedūrų sėkmei tiek atliekant procedūrą su šviežiais embrionais (angl. *fresh embryo*), tiek su užšaldytais embrionais ($p = 0,74$). Tyrime buvo analizuotas keturių metų laikotarpis, kurio metu iš viso buvo atlikta 5676 procedūros. Šviežių embrionų grupėje apvaisinimo dažnio, vidutinio patalpintų embrionų skaičiaus ir klinikinio nėštumo priklausomybė nuo patalpintų embrionų skaičiaus statistiškai reikšmingai nekoreliavo tarp metų laikų ar skirtingų mėnesių. Panašūs rezultatai gauti analizuojant ir atšildytų embrionų grupę – nenustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pastojimo dažnio ir sezoniškumo. Būtent klinikinis pastojimas ir yra pagrindinis sėkmingo pagalbinio apvaisinimo procedūrų rodiklis. Tuo pačiu mokslininkai nustatė, kad pagalbinio apvaisinimo procedūros metu gautų kiaušialąsčių skaičius priklauso nuo moters amžiaus ($p < 0,001$), tačiau

nepriklauso nuo procedūros atlikimo laiko ($p = 0,43$ ir $p = 0,30$ atitinkamai šviežių ir užšaldytų embrionų grupėse).

Tais pačiais metais kitos mokslininkų grupės tyrimas pasižymėjo panašiais rezultatais (Xiao et al., 2018). Išanalizuotos 2868 pagalbinio apvaisinimo procedūros (atliktos per penkerių metų laikotarpį) neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pacienčių amžiaus, nevaisingumo trukmės, kūno masės indekso (angl. *body mass index*, BMI) ir skirtingų metų laikų ($p > 0,05$). Skirto gonadotropino dozė žiemą buvo statistiškai reikšmingai didesnė lyginant su vasaros ir pavasario grupėmis ($p < 0,05$). Vidutinis subrendusių kiaušialąsčių skaičius rudenį ($9,85 \pm 5,06$) buvo šiek tiek didesnis lyginant su pavasario grupe ($8,65 \pm 4,27$), bet skirtumas nebuvo reikšmingas ($p > 0,05$). Visos keturios grupės tarpusavyje neturėjo statistiškai reikšmingo skirtumo vertinant gautų kiaušialąsčių skaičių, apvaisinimo ir dalinimosi (angl. *cleavage*) dažnį. Pacienčių nėštumo parametrai tokie kaip implantacijos dažnis, klinikinio pastojimo dažnis, pagimdymo dažnis ir spontaniinio persileidimo (angl. *spontaneous abortion*) dažnis skirtingais metų laikais statistiškai reikšmingai taip pat nesiskyrė ($p > 0,05$).

2011 m. Kroatijos mokslininkų atliktas tyrimas siekė atskleisti, ar pagalbinio apvaisinimo procedūros atlikimo laikas turi įtakos jos kokybei (Rienzi et al., 2011). Į eksperimentą buvo įtraukta 2140 procedūrų, kurios buvo atliktos 2000 – 2007 m. laikotarpiu. Atlikus statistinę analizę rezultatai parodė, kad gautų kiaušialąsčių skaičius didžiausias buvo vasarą, mažiausias – žiemą, o patalpintų embrionų skaičius mažiausias buvo vasarą bei panašiai vienodas visais kitais mėnesiais, tačiau statistiškai reikšmingai nesiskyrė nei vienas iš šių parametru. Didžiausias patalpintų geros kokybės embrionų skaičius buvo pastebimas pavasario periodu, o mažiausias rudenį, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Pastebėta, kad kiaušialąsčių apvaisinimo dažnis tendencingai kildavo nuo žiemos, piką pasiekdavo pavasario metu (84,3 %) ir proporcingai mažėdavo iki rudens (71,3 %), tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Embrionų kokybė taip pat statistiškai reikšmingai nesiskyrė lyginant skirtingais metų laikais: geros kokybės embrionų mažiausiai išsivystydavo rudenį (32,5 %), o didžiausias tokių embrionų procentas buvo gaunamas pavasarį – 47,1 %. Galiausiai mokslininkai išsiaiškino, jog pagalbinio apvaisinimo procedūros atlikimo laikas neturi statistiškai reikšmingos įtakos ir pastojimo dažniui. Geriausiai pastoti sekėsi pacientėms, kurios procedūrą atlikdavo rudenį (33,8 %), o prasčiausiai – vasarą (23,4 %), bet šis skirtumas reikšmingo nebuvo ($p > 0,05$).

2005 m. Italijos mokslininkų atliktame tyrime (Revelli et al., 2005) išanalizuotos 2067 (statistinė analizė atlikta su 1913) procedūros, atliktos per 6-erių metų laikotarpį (1998 m. – 2003 m.). Kaip teigia autoriai, procedūros, kuriose buvo naudoti užšaldyti embrionai, nebuvo

įtrauktos į analizę. Buvo norima sužinoti, ar metų laikas turi įtakos IVF procedūroms. Gauti rezultatai parodė, jog vidutinis kiaušialąsčių apvaisinimo dažnis buvo 53,2 % ir statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp sezonų. Taip pat nustatius geros kokybės embrionus (pagal jų blastomerų vystymąsi, simetriją ir išsidalinimą (angl. *fragmentation*)) buvo nustatyta, kad metų laikas tam neturi įtakos. Implantacijos dažnis didžiausias buvo pavasarį (nuo kovo iki gegužės – 21,2 %), o mažiausias – rudenį (nuo rugsėjo iki lapkričio – 16,8 %), bet skirtumas buvo per mažas, kad būtų reikšmingas ($p > 0,05$). Pastojimo dažnis taip pat buvo geriausias pavasario mėnesiais (40,3 %) ir blogiausias vasarą (birželio – rugpjūčio mėnesiais (32,8 %), tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo ($p > 0,05$).

2000 m. Izraelyje atlikto tyrimo metu buvo siekiama išsiaiškinti, ar metų laikai turi įtakos pagalbinio apvaisinimo procedūrų sėkmei (Rojansky and Lewin, 2000). Tyrimo imtis buvo 510 pagalbinio apvaisinimo mėgintuvėlyje (angl. *in vitro* fertilization, IVF) ciklą. Gauti rezultatai parodė, jog procedūros atlikimo laikas statistiškai reikšmingai koreliuoja su kiaušialąsčių apvaisinimo dažniu ($p < 0,05$) (apsivaisinimo dažnis žiemą buvo 73,7 %, pavasarį – 74,7 %, vasarą – 67,7 %, rudenį – 65,6 %). Taip pat šis parametras statistiškai reikšmingai skyrėsi ir lyginant su dienos ilgumo pokyčiu (delta) skirtingais mėnesiais ($p < 0,05$), bet kiaušialąsčių apvaisinimo dažnis nepriklausė nuo temperatūros, drėgmės, dienos ilgumo. Statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas ir lyginant geros kokybės embrionų kiekį skirtingais metų laikais ($p < 0,02$) (žiemą geros kokybės embrionai sudarė 38,2 % visų embrionų, pavasarį – 54,1 %, vasarą – 48,2 %, rudenį – 33,6 %). Geros kokybės embrionų skaičius taip pat statistiškai reikšmingai skyrėsi tiek atsižvelgiant į dienos ilgumą ($p < 0,05$), tiek ir į dienos ilgio pasikeitimus ($p < 0,05$), bet koreliacija nepastebėta su temperatūra, drėgmės lygiu ar saulės švietimo valandomis. Galiausiai mokslininkai stebėjo, kaip keičiasi pagrindinis sėkmingos pagalbinio apvaisinimo procedūros parametras – pastojimas – lyginant rezultatus skirtingais metų laikais. Pastojimo dažnis didžiausias buvo žiemą, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta ir lyginant pastojimo dažnį su temperatūra, saulės švietimo valandomis, dienos ilgumu ar oro drėgme.

1.13. Metų laikų įtaka natūraliam apvaisinimui ir gimstamumui

2014 m. JAV mokslininkų atlikto tyrimo metu buvo būtent ir siekta išsiaiškinti, kas daro įtaką gimstamumo rodikliams vidutinio išsivystymo šalyse (Hughes et al., 2014). Jie atliko eksperimentą su Nepalo šalies naujagimių duomenimis. Eksperimento imtis – 23 622 gimdymai nuo 2002 m. rugsėjo mėnesio iki 2006 m. sausio. Daugiausia gimimų per metus buvo užfiksuota

rugpjūčio – lapkričio mėnesiais, su didžiausiu gimstamumu spalį (753). Naujagimio mirčių skaičius siekė 3,21 % visų gimdymų. Didžiausias naujagimių mirtingumas buvo rugpjūčio mėnesį ir beveik dvigubai viršijo mažiausią mirtingumo reikšmę pasiektą kovo mėnesį. Negyvo naujagimio (angl. *stillbirth*) atvejų daugiausia užregistruota vasarį (5,10 %), o mažiausiai – spalį (2,78 % visų gimdymų). Tuo tarpu perinatalinis mirtingumas (angl. *perinatal mortality*) didžiausias stebėtas rugpjūtį – 7,36 %, o mažiausia šio kriterijaus vertė registruota lapkričio mėnesį ir siekė 4,84 %. Stebint kūdikių svorius apskaičiuota, jog mažo svorio (< 2,5 kg) gimė ir labai mažo svorio (<2,0 kg) gimė atitinkamai 30,5 % ir 5,1 % visų naujagimių. Didžiausia tikimybė gimti mažo svorio kūdikiui buvo apskaičiuota rugpjūtį (34,5 %), o mažiausia – vasario mėnesį (22,4 %). Panašios tendencijos pastebėtos ir vertinant tikimybę gimti labai mažo svorio: didžiausia ji rugsėjį (6,4 %), o mažiausia – taip pat vasarį (2,9 %). Tuo tarpu priešlaikinio gimimo (angl. *preterm birth*) tikimybė didžiausia buvo spalį (22,6 %), o mažiausia – gegužę (14,4 %).

Yra išsiaiškinta, kad sezoniškumas koreliuoja su prastais gimstamumo rodikliais ir varijuoja tarp skirtingų geografinių regionų bei populiacijų (CHODICK et al., 2009). Skirtinguose tyrimuose patikrinus hipotezes buvo išsiaiškinta, kad sezoniniams gimstamumo rodikliams įtakos turi atitinkami moterų vaisingumo rodikliai (Friis et al., 2004), morfologinė partnerių būklė (Wolf and Armstrong, 2012), įvairios praeityje turėtos infekcijos (Currie and Schwandt, 2013) ir netgi tam tikri maitinimosi įpročiai (Ceesay et al., 1997). Didžioji dalis šių tyrimų buvo atlikti gerai išsivysčiusiose šalyse ir tik maža dalis blogai arba vidutiniškai išsivysčiusiose šalyse, kur šių veiksnių įtaka gali būti dar reikšmingesnė natūraliam apvaisinimui ir gimstamumui.

1.14. Metų laiko reikšmė priešlaikiniam gimimui

Literatūroje aptinkama informacijos, kad priešlaikinio gimdymo tikimybė varijuoja priklausomai nuo metų laiko. Tai parodo ir Norvegijos mokslininkų atliktas tyrimas (Weinberg et al., 2015) . Iš viso išanalizavę 2 321 652 nėštumus (1967–2010 m.) jie išsiaiškino, kad ankstųjų buvo 113 876 (4,9 % visų nėštumų). Patyrinėjus, kaip sezoniškumas įtakoja gimimo per anksti tikimybę gauta, jog didžiausia tikimybė pasiekama dukart: birželio (5,1 %) ir gruodžio–sausio (5,7 %) mėnesiais, o mažiausia tikimybė stebima balandžio (4,3 %) ir rugsėjo (3,9 %) mėnesiais.

Ankstesniais metais atliktuose moksliniuose tyrimuose rezultatai panašūs. Mokslininkų iš Londono atliktame kohortos tyrime (Lee et al., 2006) buvo išsiaiškinta, jog Anglijoje

gyvenantiems žmonėms sezoniškumas priešlaikiniam kūdikio gimimui turi įtakos, tačiau skiriasi nuo kituose regionuose atliktų tyrimų rezultatų. Pavyzdžiui Japonijoje (MATSUDA and KAHYO, 1998) atliktuose panašiuose tyrimuose gauti rezultatai rodo, kad didžiausia tikimybė gimti per anksti pasiekama du kart per metus (vasarą ir žiemą), tuo tarpu Londono mokslininkų darbe didžiausia reikšmė pasiekama tik vieną kartą metuose – žiemą. Kaip diskusijoje samprotauja patys mokslininkai, šiam skirtumui įtaką gali daryti skirtingas klimatas ir nevienodos aplinkos sąlygos. Apskaičiuota, jog kūdikiai, gimę žiemą turėjo 10 % didesnę tikimybę gimti per anksti palyginti su gimusiais pavasarį. Vertinant priešlaikinio gimimo tikimybę kiekvieną mėnesį, mažiausia (5,6 %) tikimybė buvo rugsėjį, tuo tarpu didžiausia ji tapdavo sausį (6,8 %).

1.15. Sezoniškumo įtaka vyriškų lytinių ląstelių rodikliams

Viena plačiausiai tyrinėtų potemių metų laikų įtakos apvaisinimui temoje yra sezoniškumo reikšmė spermatozoidams. 2017 m. Kinijoje atliktame tyrime buvo aiškinamasi, ar metų laikai turi tiesioginės įtakos vyriškų lytinių ląstelių funkcionalumui (Mao et al., 2017). Statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) lyginant su skirtingais metų laikais buvo gautas šių parametrų: spermos tūris didžiausias buvo žiemą (3,6 ml), o mažiausias – vasarą (3,4 ml); spermatozoidų koncentracija didžiausia taip pat buvo žiemos mėnesiais ($56,7 \times 10^6/\text{ml}$), o mažiausia – vasarą ($41,5 \times 10^6/\text{ml}$); judrių spermatozoidų skaičius didžiausias buvo pavasarį (43 %) ir mažiausias – rudenį (37 %); spermatozoidų skaičius ejakuliacijos metu didžiausias buvo žiemą ($200,6 \times 10^6$), o mažiausias – vasarą ($134,0 \times 10^6$). Kiti šiame eksperimente analizuoti spermatozoidų būklę nusakantys parametrai tokie kaip normalios morfologijos spermatozoidų skaičius, spermatozoidų su galvutės ar uodegėlės pažeidimais ar spermos rūgštingumas (pH) statistiškai reikšmingai nesiskyrė skirtingais metų laikais ($p > 0,05$). Analizuojant spermatozoidų kokybę skirtingais mėnesiais gauti panašūs rezultatai. Statistiškai reikšmingai skyrėsi spermos tūris ($p < 0,05$), o didžiausias ir mažiausias reikšmės buvo pasiektos atitinkamai sausio (3,7 ml) ir birželio (3,3 ml) mėnesiais. Taip pat statistiškai reikšmingai skyrėsi spermatozoidų koncentracija, su didžiausia reikšme gruodžio mėnesį ($58,6 \times 10^6/\text{ml}$), o mažiausia – liepos mėnesį ($37,7 \times 10^6/\text{ml}$). Judrių spermatozoidų kiekis didžiausias buvo kovo ir gegužės mėnesiais (37 %), o mažiausias – rugsėjo ir lapkričio mėnesiais (44 %), ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas. Vienos ejakuliacijos metu gautų spermatozoidų skaičiaus pikas buvo gruodžio ($202,2 \times 10^6$), o žemiausia reikšmė pasiekama liepos mėnesį ($125,8 \times 10^6$). Taip pat ir spermatozoidų su uodegėlių defektais dali statistiškai reikšmingai variavo tarp skirtingų mėnesių, o kritinius taškus pasiekdavo spalį (5,8

%) bei visuose trijuose pavasario mėnesiuose (4,8 %). Visų šių parametų analizėje gautos $p < 0,05$. Spermatozoidų su galvutės defektais dalis spermoje, pH ir morfologiškai sveikų spermatozoidų skaičius statistiškai reikšmingai skirtingais mėnesiais nesiskyrė. Galiausiai mokslininkai apskaičiavo, kaip vienas aplinkos faktorius (eliminavus visus kitus) daro įtaką spermatozoidų kokybę apibūdinantiems parametrams. Gauti rezultatai parodė, jog vidutinė mėnesio temperatūra neigiamai susijusi (angl. *negatively related*) su spermatozoidų koncentracija ($p = 0,014$) ir spermatozoidų skaičiumi vienos ejakuliacijos metu ($p = 0,045$). Vidutinis kritulių kiekis buvo teigiamai susijęs (angl. *positively related*) su judrių spermatozoidų kiekiu ($p = 0,016$) ir normalia spermatozoidų morfologija ($p = 0,020$), bet neigiamai su spermatozoidų su galvutės apsigimimais skaičiumi ($p = 0,022$). Vidutinis saulės švietimo laikas (angl. *sun light*) buvo teigiamai susijęs su judrių spermatozoidų skaičiumi ($p = 0,041$), o oro kokybės indeksas (angl. *air quality index*, AQI) buvo teigiamai susijęs su spermos tūriu ($p = 0,004$) ir spermatozoidų skaičiumi ejakuliacijos metu ($p = 0,012$).

2013 m. publikuotame tyrime mokslininkų iš Izraelio grupė tyrinėjo, ar sezoniškumas turi įtakos spermatogenezei bei spermatozoidų kokybei (Levitas et al., 2013). Eksperimento metu buvo išanalizuoti 6455 spermos mėginiai ir suskirsčius į dvi grupes atlikta statistinė analizė. Tik 6,6 % normospermija (angl. *normozoospermic*) (1 grupė) pasižyminčių pacientų buvo vyresni nei 45 metų, todėl, kaip teigia autoriai, amžius gautiems rezultatams turėtų daryti minimalią arba išvis jokios įtakos. Iš 4960 pirmos grupės pacientų buvo nustatyta, jog metų laikas neturi įtakos spermos tūriui (angl. *semen volume*), tačiau spermatozoidų koncentracija buvo statistiškai reikšmingai didesnė šaltuoju metų periodu palyginus su karštuoju periodu ($p < 0,02$). Tuo tarpu judrių spermatozoidų kiekis (angl. *motility*) buvo statistiškai reikšmingai didesnis šiltuoju metų periodu (49,29 %) lyginant su šaltuoju (39,64 %) ($p < 0,0001$). Suskirsčius metų laikus ketvirčiais gauta, jog didžiausias spermatozoidų judrumas yra pasiekiamas vasaros (49,34 %) ir rudens (47,77 %) mėnesiais, o statistiškai reikšmingai mažiausias žiemos metu (36,88 %) ($p < 0,001$). Analizuojant, kaip skiriasi gerai judančių (angl. *fast motility*) spermatozoidų kiekis, rezultatai priešingi: karštuoju sezonu jų buvo statistiškai reikšmingai mažiau (3,93 %) nei šaltuoju (4,83 %) ($p < 0,0001$). Skirstant pagal ketvirčius, žiemą buvo rastas didžiausias greitai judančių spermatozoidų skaičius (5,03 %) ir statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p < 0,0001$) palyginti su kitais metų laikais, kai vasarą buvo fiksuotas mažiausia tokių spermatozoidų koncentracija (3,45 %). Spermatozoidų koncentracija skirtingais metų laikais taip pat skyrėsi statistiškai reikšmingai: pavasarį ji buvo didžiausia ($71,96 \times 10^6/\text{ml}$) ir nuosekliai mažėjo visą karštąjį laikotarpį iki rudens ($54,66 \times 10^6/\text{ml}$), o vėliau vėl didėjo ir žiemą siekdavo ($70,21 \times 10^6/\text{ml}$) ($p < 0,001$). Analizuojant spermatozoidų su normalia morfologine struktūra (angl. *normal morphology*) skaičius bandiniuose gauta, jog

statistiškai reikšmingai daugiau jų pagaminama žiemos mėnesiais (8,91 %) nei vasarą (8,30 %) ($p < 0,03$).

Tyrimė taip pat buvo išnagrinėti ir pacientai, kurių spermatozoidams pasireiškė oligospermija (angl. *oligozoospermic sperm*). Iš 1495 šios grupės tiriamųjų 4,2 % buvo vyresni nei 45 metai. Vertinant spermatozoidų judrumą, gauti panašūs rezultatai kaip ir tarp pirmos grupės pacientų: šiltuoju metų laikotarpiu (31,23 %) buvo statistiškai reikšmingai didesni lyginant su šaltuoju periodu (26,18 %) ($p < 0,001$). Greitai judančių ir morfologiškai normalių spermatozoidų skaičius statistiškai reikšmingai nesiskyrė lyginti tarp sezonų. Gerai judančių spermatozoidų skaičius skirtingais metų laikais buvo statistiškai reikšmingai didesnis vasaros (29,96 %) ir rudens (32,29 %) laikotarpiu lyginant pavasario (16,61 %) ir žiemos (11,38 %) mėnesiais ($p < 0,0001$). Tuo tarpu blogai judančių spermatozoidų skaičius didžiausią reikšmę pasiekia rudenį (16,61 %), o mažiausia vertė yra žiemą (11,38 %), tačiau skirtumas nėra statistiškai reikšmingas. Morfologiškai normalių spermatozoidų skaičius piką pasiekia pavasarį (6,78 %), o mažiausias būna vasaros mėnesiais (5,61 %) ir šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,02$).

2009 m. publikuotame Graikijos mokslininkų tyrimė taip pat buvo ieškota sąsajų tarp metų laikų kaitos ir spermatozoidų kokybės (Adamopoulos et al., 2009). Gauti rezultatai atskleidė, jog spermos koncentracija didžiausia buvo vasaros metu ($54,0 \times 10^6$ /ml), o mažiausia – žiemą ($30,0 \times 10^6$ /ml) ir skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,03$). Taip pat statistiškai reikšmingai skyrėsi ir judrių spermatozoidų kiekis ($p < 0,02$), su didžiausia reikšme rudens mėnesiais (52,3 %), o žemiausia verte žiemą (35,6 %). Spermatozoidų su normalia morfologija skaičius didžiausias buvo vasarą (62,5 %), o mažiausias rudenį (50,3 %), ir skirtumas tarp metų laikų ir šio parametro buvo taip pat statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$). Tiesa, šio eksperimento imtį sudarė tik 86 mėginiai.

2004 m. Masačusetso universiteto mokslininkų atlikto tyrimo metu buvo analizuota, kaip metų laikas keičia įvairius spermatozoidų kokybės parametrus (Chen et al., 2004). Eksperimento metu buvo išanalizuoti 306 pacientų mėginiai. Gauta vidutinė visų spermatozoidų koncentracija buvo aukštesnė už pasaulio sveikatos organizacijos nustatytą ribą. Spermatozoidų koncentracija pavasarį ($137,2 \times 10^6$ /ml) buvo statistiškai reikšmingai didesnė nei žiemą ($99,2 \times 10^6$ //ml), rudenį ($90,6 \times 10^6$ //ml) ar vasarą ($93,1 \times 10^6$ /ml) ($p < 0,05$). Vidutinis judrių spermatozoidų skaičius taip pat didesnis buvo pavasarį (52,3 %) nei visais kitais mėnesiais (47,7 %, 47,1 %, 44,3 % atitinkamai vasarą, rudenį ir žiemą), bet skirtumas buvo beveik statistiškai reikšmingas ($p = 0,06$). Morfologiškai normalių spermatozoidų skaičius taip pat skyrėsi darant palyginimą tarp metų laikų, tačiau skirtumas irgi nebuvo statistiškai

reikšmingas: pavasarį (7,5 %), vasarą (6,7 %), rudenį (7,0 %) ir žiemą (6,4 %). Panaši tendencija be statistiškai reikšmingo skirtumo gauta ir spermos tūrio bei pH parametrais skirtingais metų laikais. Nuo pacientų amžiaus statistiškai reikšmingai nepriklausė nei vienas iš šių parametru.

1.16. Mėnulio fazių įtaka apvaisinimui ir lytinėms ląstelėms

Italijos vyrų vaisingumo klinikos atliktame tyrime, kurio metu buvo išanalizuoti 386 spermos mėginiai, buvo siekiama išsiaiškinti, ar mėnulio fazių kaita daro įtaką pagrindiniams spermatozoidų vaisingumo parametrams (Moretti et al., 2008). Gautų mėginių skaičius esant skirtingos fazės mėnuliui pasiskirstė labai tolygiai. Statistiškai reikšmingo skirtumo negauta ir tarp tokių analizuotų parametru kaip spermos pH ir koncentracija, spermatozoidų tankis, greitai ir lėtai judančių spermatozoidų dalis spermoje bei lytinių ląstelių morfologinė būklė ir mėnulio fazės ($p > 0,05$). Nors skirtumas ir tarp spermos tūrio ir mėnulio fazių nebuvo gautas, mokslininkai pastebėjo, jog esant pilnačiai šis parametras yra žemesnis lyginant su kitomis mėnulio fazėmis ($p > 0,05$). Taip pat pastebėta, jog spermos klampumas (angl. *viscosity*) buvo mažesnė jaunaties metu lyginant su kitomis fazėmis, nors šis skirtumas ir nepasiekė statistiškai reikšmingos ribos ($p > 0,05$).

2006 m. tyrime analizuojant 312 menstruacinių ciklu buvo aiškinamasi, ar jiems įtakos turi mėnulio fazės (Zimecki, 2006). Gauti rezultatai parodė, jog 47 moterims menstruacijos vyko esant priešpilnio ir delčios mėnulio fazėms. Pusė ovuliacijos atvejų vykdavo jaunaties metu. Net ir moterims, kurioms pasireiškia nereguliarios menstruacijos, ovuliacija dažniausiai vykdavo mėnuliui esant jaunaties fazėje. Kaip aiškino patys tyrėjai, tokioms tendencijoms įtakos gali turėti natūraliai mėnulio sukeliama elektromagnetinės radiacijos pasikeitimas, kuris būtent ir veikia moterų menstruacijos ciklą. Kitame anksčiau atliktame eksperimente (Law, 1986) taip pat nagrinėjus, kokiai mėnulio fazei esant moterims prasideda ovuliacija, nustatyta, jog didžioji dalis (28,3 %) ovuliacijų taip pat vyksta esant jaunačiai, kai tuo tarpu vyraujant kitoms mėnulio fazėms ovuliacija vykdavo daug rečiau (8,8–12,6 %) ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$) (tyrime dalyvavo 826 moterys).

2005 m. publikuotame tyrime, kur buvo išanalizuota 721 embrionų patalpinimo procedūra, buvo ieškoma sąsajų tarp mėnulio fazių ir pagalbinio apvaisinimo procedūrų efektyvumo (Das et al., 2005). Lyginant visas keturias mėnulio fazes, embrionų talpinimo procedūrų skaičius buvo labai panašus. Moterų amžius, pagalbinio apvaisinimo procedūros tipas (IVF ar ICSI) taip pat statistiškai reikšmingai nesiskyrė esant skirtingoms mėnulio fazėms

($p > 0,05$). Biocheminio nėštumo atsiradimas esant skirtingai mėnulio fazei buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$). 30,1 % moterų apie nėštumą sužinojo jaunaties metu, 25,7 % – priešpilnio, 25,1 % – pilnaties ir 22,9 % delčios metu. Taip pat mokslininkai šio eksperimento metu nustatė, jog pastojusių ir nepastojusių moterų amžius statistiškai reikšmingai skyrėsi ir buvo atitinkamai $34,3 \pm 4,17$ ir $33,3 \pm 3,45$ metai ($p < 0,05$).

2. TYRIMO METODAI IR TIRIAMASIS OBJEKTAS

Duomenų gavimas

Šio tyrimo metu buvo matuota dvejų metų (2017 ir 2018 m.) pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautų kiaušialąsčių ZP storiai. Procedūrų efektyvumo analizės dalyje buvo analizuota didesnė imtis: 2016–2019 m. duomenys. Visos procedūros buvo atliktos Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Santaros vaisingumo centre (SVC). Per 2017 m. ir 2018 m. buvo atlikta 590 kiaušidžių punkcijų, o 2016–2019 m. atliktos 1035 procedūros. Prieš atliekant procedūras, visos pacientės pasirašė sutikimo formas, kad jų nuasmeninti duomenys galės būti panaudoti studentų rezidentų mokymo ir mokslinių tyrimų tikslams. Tyrimui atlikti buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti tyrimą Nr. 2021/3-1327-804. Storių matavimai buvo atliekami analizuojant kiaušialąsčių nuotraukas, kurios buvo daromos kiekvienai kiaušialąstei atskirai, pirmą parą vertinant jų apvaisinimą po atliktų IVF arba ICSI procedūrų. Iš 590 atliktų kiaušialąsčių punkcijų buvo išmatuotos 5094 kiaušialąstės.

Informacija apie temperatūrą, saulės švietimo valandas bei kritulių kiekį buvo gauti iš Lietuvos hidrometeorologijos tarnybos. Temperatūra buvo pateikta kaip vidutinė kiekvieno mėnesio reikšmė (2.1 lentelė), o saulės švietimo valandos (2.2 lentelė) ir kritulių kiekis (2.3 lentelė) buvo suminiai atskiram mėnesiui. Informacija apie mėnulio fazę gauta iš „Google Calendar“. Atliekant statistinę analizę, visi šie parametrai su pagalbinio apvaisinimo procedūrų registro ir matavimų duomenimis buvo sugretinti pagal dieną, kada buvo atlikta pagalbinio apvaisinimo procedūra.

2.1 lentelė. Vidutinė oro temperatūra (°C) Lietuvoje 2016-2019 m.

| Mėnuo | 2016 m. | 2017 m. | 2018 m. | 2019 m. |
|-----------|---------|---------|---------|---------|
| Sausis | -7,0 | -3,2 | -1,5 | -3,9 |
| Vasaris | 1,5 | -1,8 | -6,1 | 1,2 |
| Kovas | 1,9 | 3,1 | -2,0 | 3,1 |
| Balandis | 7,0 | 5,1 | 9,5 | 8,6 |
| Gegužė | 14,6 | 12,3 | 16,4 | 12,4 |
| Birželis | 17,2 | 15,1 | 17,0 | 20,1 |
| Liepa | 18,3 | 16,5 | 20,0 | 16,9 |
| Rugpjūtis | 16,9 | 17,2 | 19,1 | 17,8 |
| Rugsėjis | 13,6 | 13,2 | 14,6 | 12,9 |
| Spalis | 5,3 | 7,4 | 8,5 | 9,3 |
| Lapkritis | 1,4 | 4,0 | 2,8 | 4,9 |
| Gruodis | 0,8 | 1,3 | -0,8 | 2,6 |

2.2 lentelė. Saulės švietimo trukmė (val.) Lietuvoje 2016–2019 m.

| Mėnuo | 2016 m. | 2017 m. | 2018 m. | 2019 m. |
|-----------|---------|---------|---------|---------|
| Sausis | 55 | 41 | 30 | 36 |
| Vasaris | 51 | 48 | 80 | 71 |
| Kovas | 108 | 105 | 161 | 120 |
| Balandis | 166 | 157 | 237 | 312 |
| Gegužė | 321 | 319 | 377 | 225 |
| Birželis | 301 | 242 | 306 | 355 |
| Liepa | 206 | 230 | 243 | 255 |
| Rugpjūtis | 192 | 242 | 262 | 267 |
| Rugsėjis | 189 | 138 | 206 | 179 |
| Spalis | 68 | 62 | 155 | 94 |
| Lapkritis | 32 | 26 | 30 | 21 |
| Gruodis | 25 | 22 | 10 | 27 |

2.3 lentelė. Kritulių kiekis (mm) Lietuvoje 2016–2019m.

| Mėnuo | 2016 m. | 2017 m. | 2018 m. | 2019 m. |
|-----------|---------|---------|---------|---------|
| Sausis | 46 | 36 | 60 | 65 |
| Vasaris | 75 | 42 | 22 | 35 |
| Kovas | 36 | 53 | 18 | 48 |
| Balandis | 51 | 59 | 49 | 2 |
| Gegužė | 45 | 13 | 30 | 51 |
| Birželis | 52 | 82 | 31 | 34 |
| Liepa | 108 | 116 | 103 | 86 |
| Rugpjūtis | 113 | 82 | 65 | 67 |
| Rugsėjis | 21 | 129 | 44 | 68 |
| Spalis | 84 | 138 | 62 | 65 |
| Lapkritis | 77 | 80 | 19 | 48 |
| Gruodis | 65 | 77 | 61 | 52 |

Vaizdų gavimas

Pirmą parą po atliktos pagalbinio apvaisinimo procedūros buvo vertinamas kiaušialąsčių apvaisinimas, kiaušialąstės buvo vizualizuojamos naudojant *Inverted Research Microscope*

ECLIPSE Ti mikroskopą, fotografuojamos naudojant *Nikon DS-Qi1* kamerą, o gauti vaizdai išsaugomi kompiuteryje ir šio tyrimo metu analizuoti naudojant *NIS-Elements F* vaizdų apdorojimo programą. Vaizdas nuotraukoje buvo padidintas 200 kartų. Iš viso buvo išanalizuotos 5094 apvaisintų kiaušialąsčių nuotraukos. Nuotraukos buvo dviejų skirtingų fokusavimų: $0,85\mu\text{m}/\text{px}$ ir $3,38\mu\text{m}/\text{px}$ (px – pikseliai) raiškos.

Storių matavimas

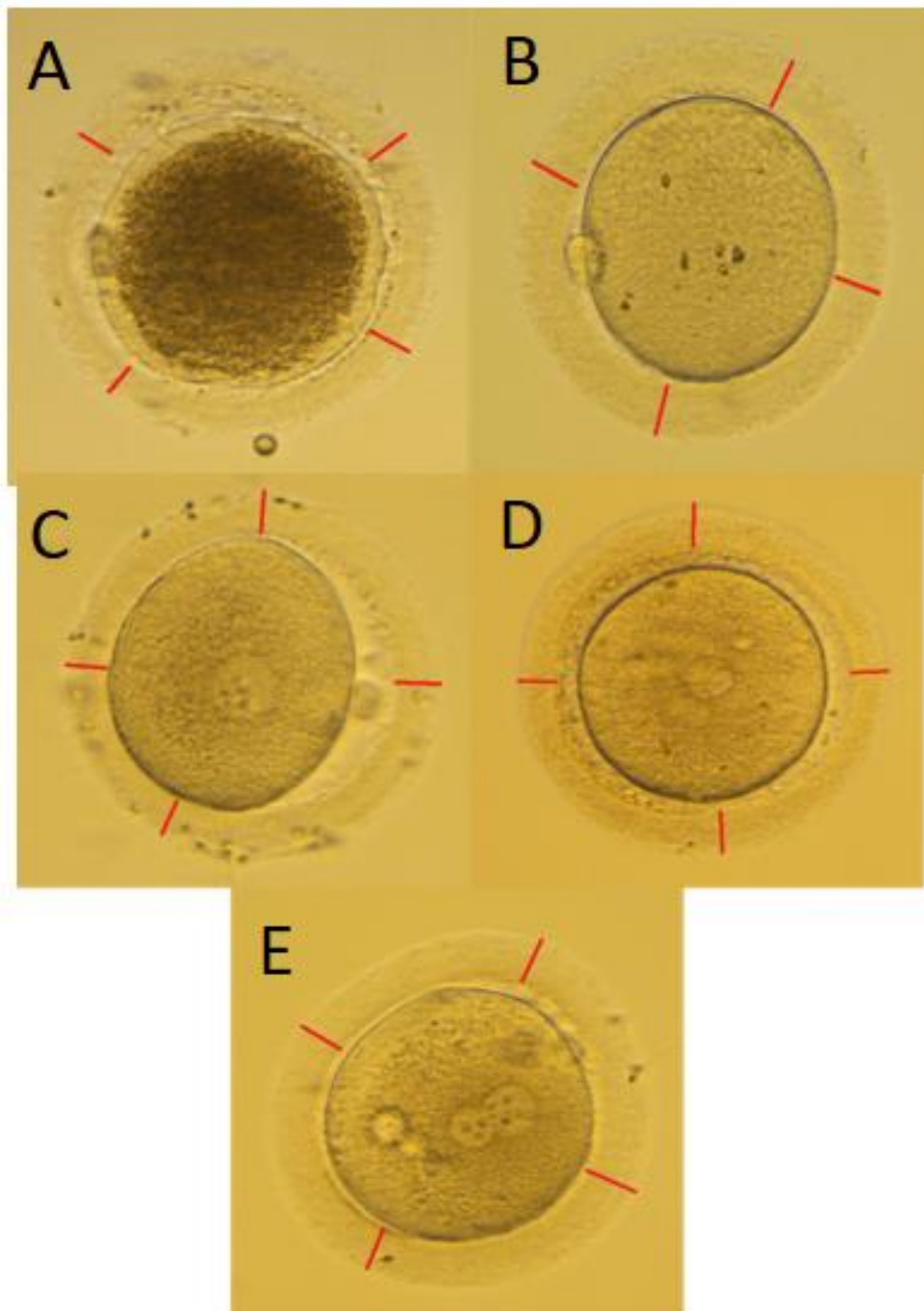
Kiaušialąsčių ZP storiui įvertinti kiekvienai kiaušialąstei buvo atliekama po 4 matavimus (2.1 pav.). Iš keturių duomenų buvo išvedamas vidurkis kiekvienai kiaušialąstei atskirai. Vaizdų apdorojimo programa pateikdavo ilgį pikseliais, todėl, siekiant gauti ilgį mikrometrais, gautas ilgis (px) buvo dauginamas iš nuotraukos raiškos ($\mu\text{m}/\text{px}$). Matuojant, programa ilgius pateikdavo su 3 skaitmenimis po kablelio, todėl tolesnė analizė atlikta būtent su tokiais dydžiais. Siekiant kaip įmanoma labiau išvengti matavimo klaidų, storiai matuoti tik tų kiaušialąsčių, kurių nuotraukų kokybė buvo gera (ryškios, nesusiliejusios).

Kiaušialąsčių apvaisinimo vertinimas

Analizuojant nuotraukas ir jose matomą vaizdą buvo nustatoma, kurios kiaušialąstės apvaisino, o kurios – ne. Kiaušialąsčių apvaisinimo vertinimą atliko VTP embriologės. Duomenys apie kiaušialąsčių apvaisinimą buvo surašyti į SVC registrą. Apsivaisinimas vertinamas 18–22 val. po atliktos pagalbinio apvaisinimo procedūros. Jeigu tuo metu kiaušialąstės nuotraukoje buvo matomi du probranduoliai (angl. *pronucleus*, PN), buvo laikoma, kad apvaisinimas sėkmingas ir įvykęs teisingai (2.1. pav. D). Tačiau apvaisinimas buvo konstatuotas ne visose kiaušialąstėse. Dalyje kiaušialąsčių buvo stebimas ir neteisingas apvaisinimas – matomi vienas ar daugiau nei du probranduoliai. Pagal apvaisinimo pobūdį, visos šio tyrimo metu matuotos kiaušialąstės turėjo vieną iš penkių skirtingų vertinimų (2.1. pav.):

- deg – degradavusi kiaušialąstė;
- 0 – neapsivaisinusi kiaušialąstė;
- 1 – neteisingai apvaisinusi kiaušialąstė (susidaro vienas haploidinis probranduolys (PN));
- 2 – teisingai apvaisinusi kiaušialąstė (susidaro 2 haploidiniai probranduoliai (PN), kurie ir parodo, jog apvaisinimas buvo sėkmingas);

- 3 – neteisingai apvaisinusi kiaušialąstė (susidaro 3 haploidiniai probranduoliai (PN)). Taip nutinka todėl, jog kiaušialąstę apvaisina daugiau nei vienas spermatozoidas (polispermija).



Pav. 2.1. Kiaušialąsčių apvaisinimo vertinimas 18–22 val. po apvaisinimo (A – degradavusi kiaušialąstė, B – neapvaisinusi kiaušialąstė, C – 1PN kiaušialąstė, D – 2 PN kiaušialąstė, E – 3 PN kiaušialąstė).

Statistinė analizė

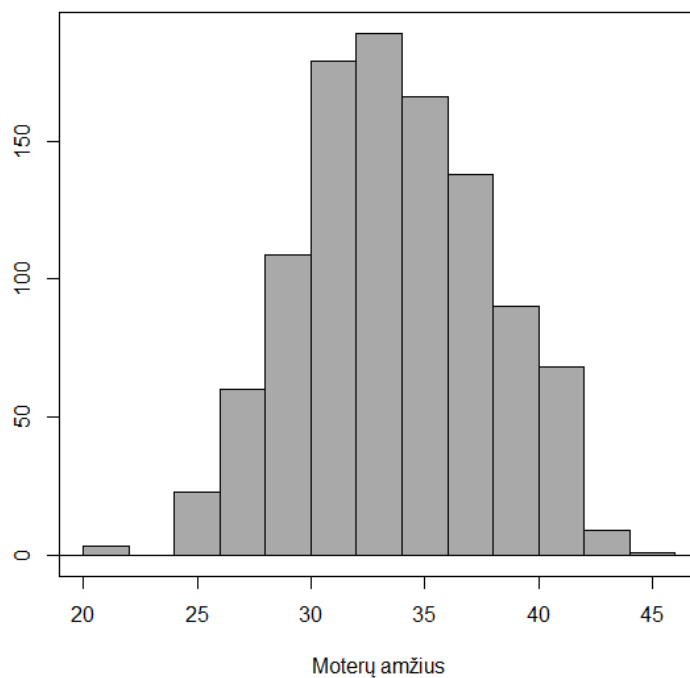
Visi matavimų duomenys buvo vedami į „Microsoft Excel“ programą. Matavimų rezultatai pateikiami kartu su standartinio nuokrypio (SD) reikšme. Duomenys tarp dviejų grupių buvo lyginti naudojant Velšo t testą (angl. *Welsh two sample t test*), o tarp daugiau nei dviejų grupių pasitelkiant vienfaktorinę dispersinę analizę (angl. *one-way ANOVA*). Atliekant aprašomąją statistiką, rezultatai buvo pateikti nurodant reikšmę ir dalį procentais toje grupėje (%), palyginimai tarp grupių atlikti naudojant Chi-kvadrato testą (angl. *Chi-square test of independence*). Statistinė analizė buvo atliekama naudojant „R Studio“ ir „R Studio Commander“ programas. Skirtumas tarp grupių laikytas reikšmingu, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Tiriamųjų charakteristika

Tyrimas buvo dviejų dalių: kiaušialąsčių skaidriojo dangalo storio ir sezoniškumo bei metų laikų koreliacijų analizė ir metų laikų ir sezoniškumo įtaka pagalbinio apvaisinimo procedūrų efektyvumui. Pirmosios dalies metu analizuotos 2017–2018 m. atliktų 590, pagalbinio apvaisinimo procedūrų (IVF arba ICSI) metu gautos kiaušialąstės. Vidutinis moterų, kurioms atliktos procedūros, amžius buvo $34,2 \pm 4,09$ metai. 370 (62,7 %) moterų procedūros metu buvo 35 metų amžiaus arba jaunesnės, o likusios 220 (37,3 %) moterų buvo vyresnės nei 35 metai (3.1. pav.). 359 (60,8 %) pacientėms buvo atlikta IVF, 231 (39,2 %) – ICSI pagalbinio apvaisinimo procedūra.

Antroje tyrimo dalyje analizuota 1035 pagalbinio apvaisinimo procedūrų (atliktų 2016-2019 m.) metu gautų kiaušialąsčių skaičius bei spermatozoidų koncentracija. Vidutinis šios grupės pacienčių amžius buvo $34,1 \pm 4,10$ metai. 505 (48,8 %) moterys procedūros metu buvo 35 metų amžiaus arba jaunesnės, o likusios 530 (51,2 %) moterų buvo vyresnės nei 35 metai (3.1. pav.). 644 (62,2 %) šios grupės pacientėms buvo atlikta IVF, 391 (37,8 %) – ICSI pagalbinio apvaisinimo procedūra.

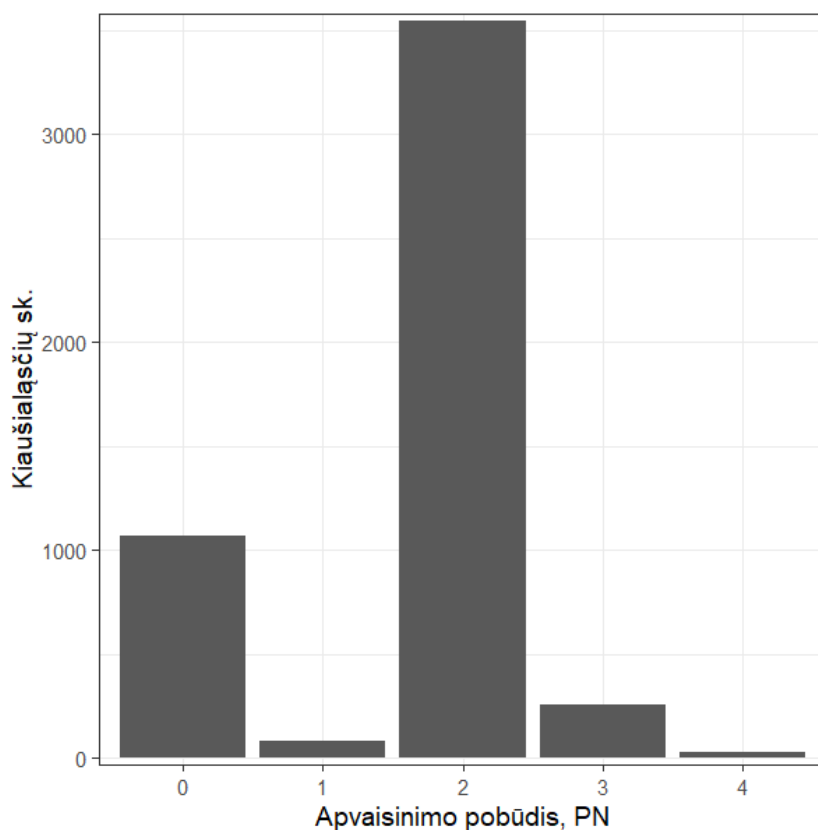


Pav. 3.1. Moterų, kurioms atliktos pagalbinio apvaisinimo procedūros (atliktų 2016-2019 m.) amžiaus pasiskirstymas.

Kiaušialąsčių charakteristika

Tyrimo metu ZP storio matavimai atlikti 5094 kiaušialąstėms. Vėliau, atsižvelgiant į kiaušialąsčių kokybės įvertinimą, 117 degradavusios kiaušialąstės buvo atmetos iš tyrimo, tolimesnė statistinė analizė buvo atlikta su likusiomis 4977 kiaušialąstėmis. Vienai moteriai vidutiniškai buvo išpunktuotos $9,3 \pm 5,7$ kiaušialąstės. Individualiai šis skaičius buvo labai įvairus: vienos moterys hormoninės stimuliacijos metu sugebėjo subrandinti vos vieną ar dvi kiaušialąstes, kai tuo tarpu buvo tokių, kurioms pavyko subrandinti 20 ir daugiau kiaušialąsčių (mažiausia subrendo 1 kiaušialąstė, daugiausiai – net 87). Tai paaiškina tokią didelę standartinio nuokrypio reikšmę. Iš analizei atrinktų 4977 kiaušialąsčių, 3331 (66,9 %) buvo apvaisintos IVF, o likusios 1646 (33,1 %) – ICSI procedūros pagalba.

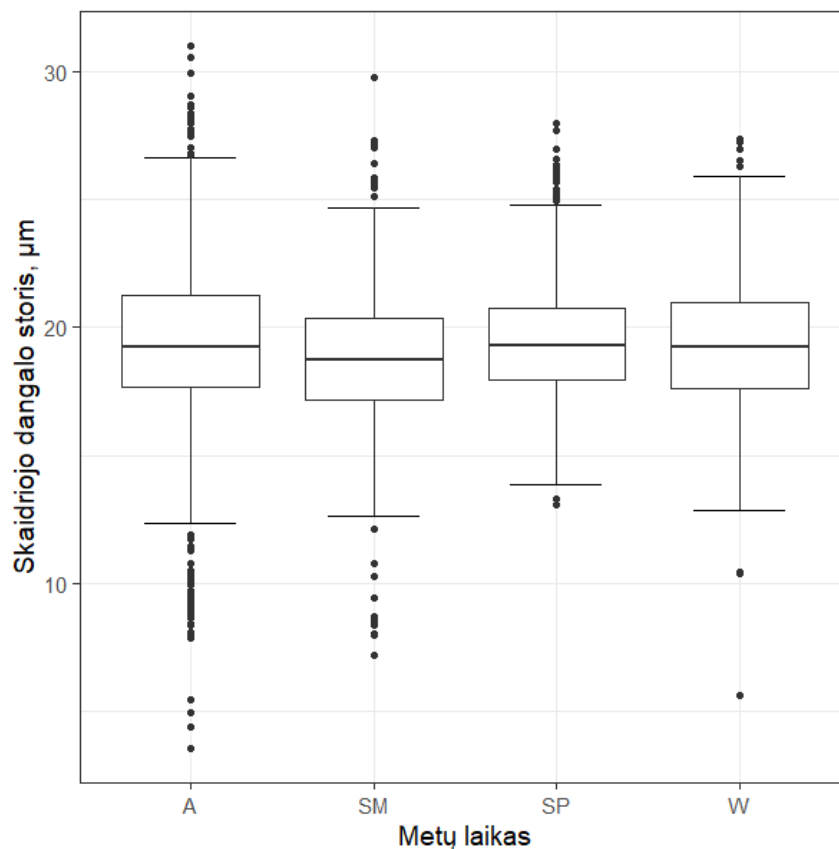
Analizuojant kiaušialąsčių apvaisinimo pobūdžio pasiskirstymą nustatyta, kad neapsivaisino (0PN) 1070 (21,5 %) kiaušialąsčių, 80 (1,6 %) apvaisino susidarant vienam probranduoliui (1PN), 3547 (71,3 %) kiaušialąsčių apvaisino teisingai, susidarant 2 probranduoliams (2PN), 256 (5,1 %) kiaušialąsčių apvaisino susidarant 3 probranduoliams (3PN), ir dar 24 (0,5 %) apvaisino susidarant 4 probranduoliams (4PN) (3.2. pav.).



Pav. 3.2. Kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apvaisinimo pobūdį.

Kiaušialąsčių ZP storio priklausomybė nuo metų laiko

Atliekant analizę, ar kiaušialąstės ZP storis priklauso nuo metų laiko, kada atliekama pagalbinio apvaisinimo procedūra, nustatyta, kad vidutinis kiaušialąstės storis rudenį yra $19,42 \pm 2,99 \mu\text{m}$, žiemą yra $19,25 \pm 2,56 \mu\text{m}$, pavasarį – $19,41 \pm 2,18 \mu\text{m}$, o vasarą – $18,80 \pm 2,65 \mu\text{m}$ (3.3. pav). Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę gauta, jog šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas tarp šių grupių ($p < 0,01$).



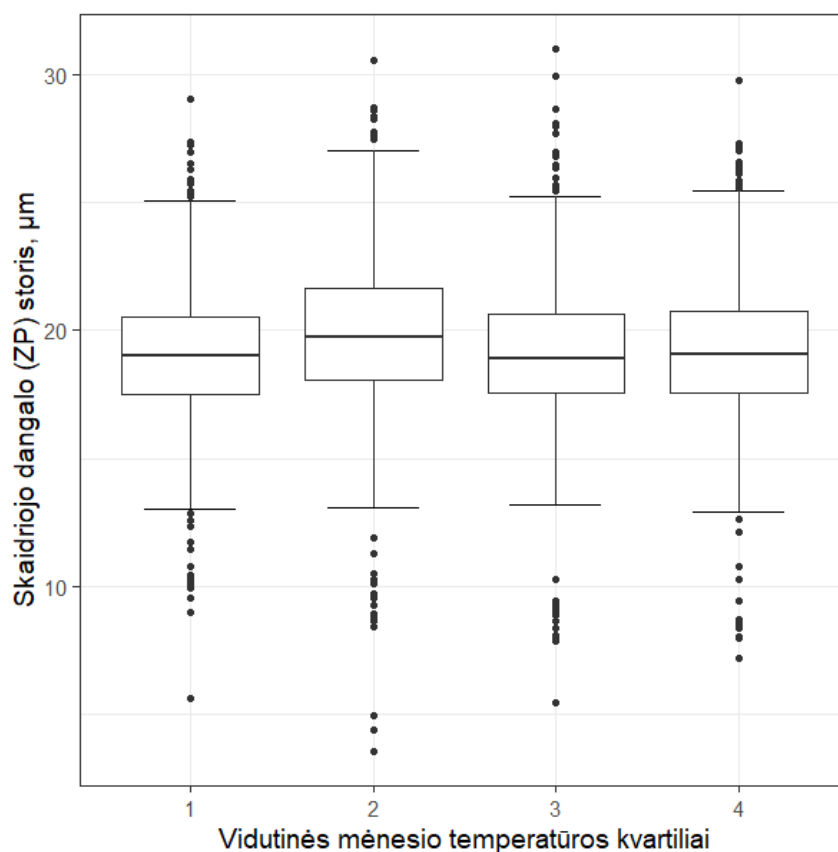
Pav. 3.3. Skaidriojo dangalo (ZP) storio skirtumai atsižvelgiant į metų laiką, μm (A – ruduo, SM – vasara, SP – pavasaris, W – žiema).

Temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų įtaka kiaušialąstės ZP storiui

Prieš atliekant meteorologinių parametų įtakos kiaušialąstės skaidriojo dangalo storiui analizę, kiaušialąstės buvo suskirstytos į keturias grupes, atsižvelgiant į temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų kvartilius. Analizuojant vidutinės mėnesio temperatūros įtaką, kiaušialąstės buvo suskirstytos į tokias grupes: 1 – $\leq 2,8 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 – $(2,8, 8,5] \text{ }^\circ\text{C}$, 3 – $(8,5, 14,6] \text{ }^\circ\text{C}$, 4 – $> 14,6 \text{ }^\circ\text{C}$. Skirstant pagal kritulių kiekio per mėnesį kvartilius, gautos grupės atrodė taip: 1 – $\leq 30 \text{ mm}$, 2 – $(30, 60] \text{ mm}$, 3 – $(60, 80] \text{ mm}$, 4 – $> 80 \text{ mm}$. Galiausiai, atliekant analizę, ar

saulės švietimo valandos turi įtakos ZP storiumi, kiaušialąstės buvo suskirstytos į tokias 4 grupes: 1 – ≤ 30 val., 2 – (30,155] val., 3 – (155,242] val., 4 – >242 val. Grupės pateiktos intervalais, kur skliaustas reiškia, kad skaičius grupei nepriklauso, kablelis tarp skaičių atspindi visus realiuosius skaičius tarp jų, o laužtinis skliaustas parodo, kad skaičius priklauso tam intervalui. Visas skirstymas į grupes atliktas tik pagal vieną parametą, nepriklausomai nuo kitų.

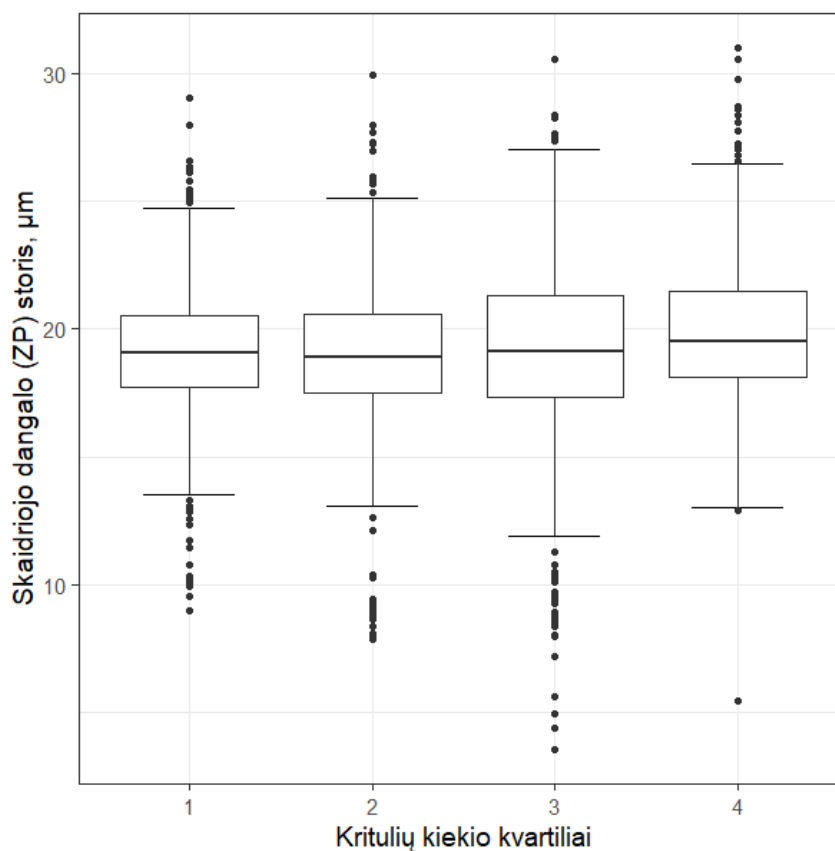
Atlikus skirstymą pagal temperatūrą gauta, kad 1 grupėje ZP storis yra $19,01 \pm 2,48 \mu\text{m}$, 2 – $19,85 \pm 2,91 \mu\text{m}$, 3 – $19,14 \pm 2,71 \mu\text{m}$, o 4 – $19,15 \pm 2,58 \mu\text{m}$ (3.4. pav.). Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę nustatyta, kad šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p \ll 0,01$). Tai reiškia, kad pagalbinio apvaisinimo procedūrą atliekant vidutinei mėnesio temperatūrai esant mažesnei arba lygiai $2,8 \text{ }^\circ\text{C}$ kiaušialąsčių ZP storis yra mažiausias, o tuo tarpu didžiausias – vidutinei temperatūrai esant $2,8\text{--}8,5 \text{ }^\circ\text{C}$.



Pav. 3.4. Skaidriojo dangalo (ZP) storio skirtumai atsižvelgiant į vidutinės mėnesio temperatūros kvartilius, μm (1 – $\leq 2,8 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 – (2,8, 8,5], 3 – (8,5,14,6] $^\circ\text{C}$, 4 – $>14,6 \text{ }^\circ\text{C}$)

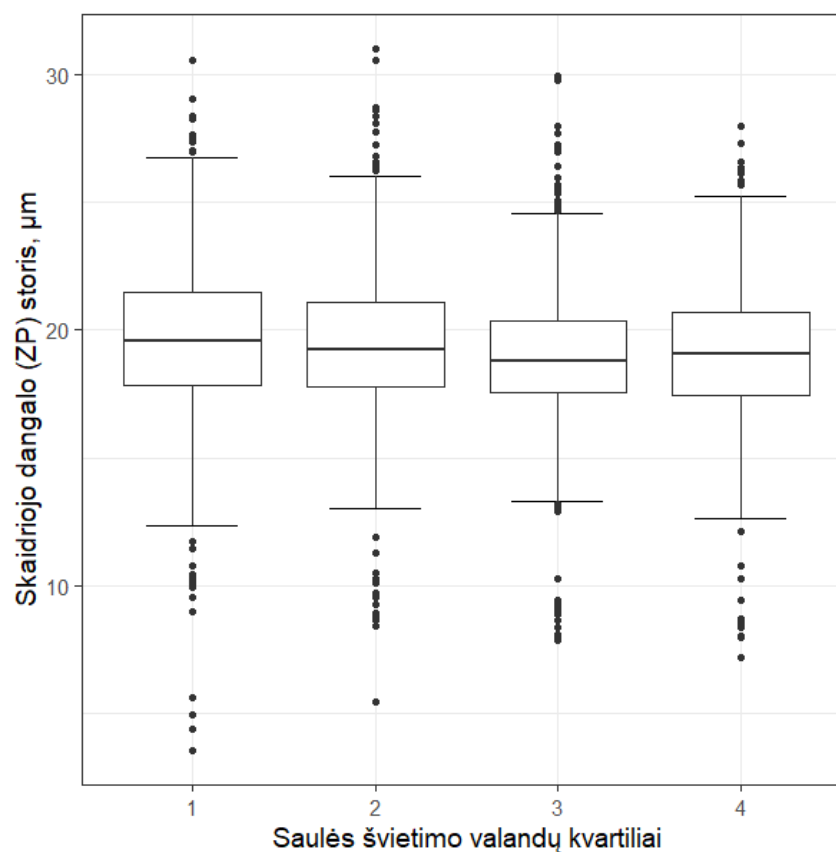
Atlikus kiaušialąsčių skirstymą pagal kritulių kiekį nustatyta, kad 1 grupėje ZP storis yra $19,11 \pm 2,31 \mu\text{m}$, 2 – $19,02 \pm 2,57 \mu\text{m}$, 3 – $19,23 \pm 3,16 \mu\text{m}$ ir ketvirtoje – $19,86 \pm 2,59 \mu\text{m}$ (3.5. pav.). Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę nustatyta, kad šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p \ll 0,01$) ir tai parodo, kad atliekant pagalbinio apvaisinimo

procedūrą tą mėnesį, kai kritulių kiekis yra 30-60 mm, kiaušialąsčių ZP yra ploniausia, o storiausia – tą mėnesį, kai iškrenta daugiau nei 80 mm kritulių.



Pav. 3.5. Skaidriojo dangalo (ZP) storio skirtumai atsižvelgiant į kritulių kiekio per mėnesį kvartilius, μm (1 – ≤ 30 mm, 2 – (30, 60] mm, 3 – (60, 80] mm, 4 – >80 mm)

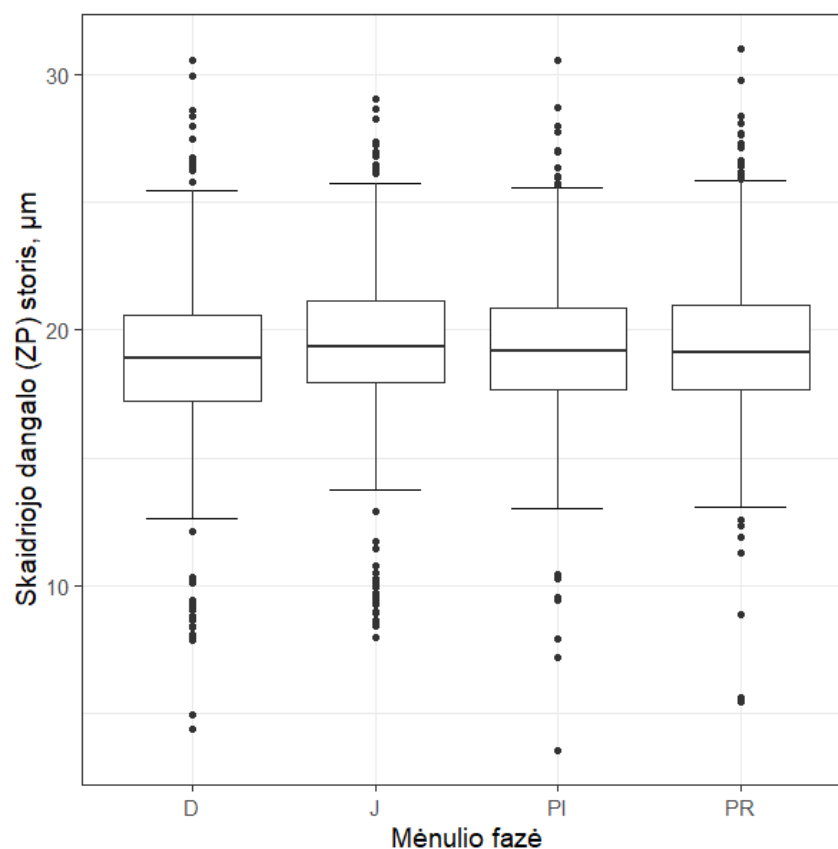
Galiausiai kiaušialąstes suskirsčius į keturias grupes pagal saulės švietimo valandas per mėnesį gauta, kad 1 grupėje ZP storis yra $19,64 \pm 2,92 \mu\text{m}$, 2 – $19,45 \pm 2,72 \mu\text{m}$, 3 – $18,99 \pm 2,43 \mu\text{m}$, o paskutinėje – $19,02 \pm 2,61 \mu\text{m}$ (3.6. pav.). Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę nustatyta, kad skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p \ll 0,01$). Todėl galima sakyti, jog ploniausias ZP atliekant pagalbinio apvaisinimo procedūras yra saulei tą mėnesį šviečiant 155-242 val., o storiausias – saulei per mėnesį šviečiant mažiau nei 30 valandų.



Pav. 3.6. Skaidriojo dangalo (ZP) storio skirtumai atsižvelgiant į saulės švietimo trukmės per mėnesį kvartilius, μm (1 – ≤ 30 val., 2 – (30,155] val., 3 – (155,242] val., 4 – > 242 val.)

Mėnulio fazės įtaka kiaušialąsčių ZP storiui

Vertinant mėnulio įtaką kiaušialąstės ZP storiui, kiaušialąstės buvo suskirstytos į keturias grupes pagal procedūros atlikimo dieną: delčia (D), jaunatis (J), priešpilnis (PR) ir pilnatis (PI). Delčios metu buvo gautos 1052 kiaušialąstės (21,1 % visų kiaušialąsčių), jaunaties metu – 1159 (23,3 %), esant priešpilnio fazės mėnuliui – 1425 (28,7%) ir esant pilnačiai – 1341 (26,9 %) (3.7. pav.). Vidutinis kiaušialąstės ZP storis didžiausias buvo esant jaunačiai ($19,47 \pm 2,70 \mu\text{m}$), o mažiausias – delčios metu ($18,95 \pm 2,96 \mu\text{m}$), o priešpilnio ir pilnaties metu gautų kiaušialąsčių ZP storio vidurkiai buvo $19,38 \pm 2,58$ ir $19,27 \pm 2,55 \mu\text{m}$ atitinkamai. Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę nustatyta, jog šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$).



Pav. 3.7. Skaidriojo dangalo (ZP) storio skirtumai atsižvelgiant į mėnulio fazę procedūros atlikimo metu, μm (D – delčia, J – jaunatis, PI – pilnatis, PR – priešpilnis)

Svarbu paminėti, kad mums prieinamose duomenų bazėse ir jose skelbiamuose literatūros šaltiniuose rasti mokslinių straipsnių, kuriuose būtų aprašyti tyrimai, analizuojantys žmonių kiaušialąsčių ZP storio priklausomybę nuo sezoniškumo, mėnulio fazės ar meteorologinių parametrų, nepavyko. Buvo skelbtas tik vienas tyrimas su pelių kiaušialąstėmis, pateiktieji rezultatai buvo neaiškūs, todėl šio tyrimo metu gautų duomenų neturime kaip palyginti su mūsų rezultatais.

Vidutinis mūsų tyrime analizuotų kiaušialąsčių ZP ilgis buvo $19,28 \pm 2,69 \mu\text{m}$. Kituose tyrimuose mokslininkai gavo įvairias vertes: kelių autorių (Bing et al., 2015 ir Shiloh et al., 2004) išmatuotas vidutinis ZP ilgis skirtingose analizuotose grupėse yra atitinkamai nuo $18,17 \pm 0,14 \mu\text{m}$ iki $19,20 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ir nuo $15,32 \mu\text{m}$ iki $20,11 \mu\text{m}$. Tuo tarpu kitų autorių (Shi et al., 2016) atliktuose tyrimuose gaunamos vidutinės ZP ilgio vertės yra mažesnės – analizuotose skirtingose grupėse vidutinis ZP ilgis buvo $11,64 \pm 1,28 \mu\text{m}$ ir $14,38 \pm 1,13 \mu\text{m}$, kito atlikto tyrimo metu net ir ženkliai mažesnės – $8,23 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ir $8,74 \pm 0,04 \mu\text{m}$ (Song et al., 2016).

Metų laikų ir mėnulio fazės įtaka kiaušialąstės apvaisinimo tipui

Kiaušialąstės pagal apsivaisinimo tipą buvo išskirstytos į 5 grupes: 0PN (nepasivaisino), 1PN, 3PN, 4PN (neteisingai apsivaisino) ir 2PN (apsivaisino teisingai). Bendras 2017 – 2018 m. analizuotų kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apsivaisinimo pobūdį yra pateiktas lentelėje žemiau (3.1 lentelė). Aprašant pasiskirstymus, kiaušialąsčių grupė su 4 probranduoliais nebuvo aprašyta dėl mažos procentinės reikšmės.

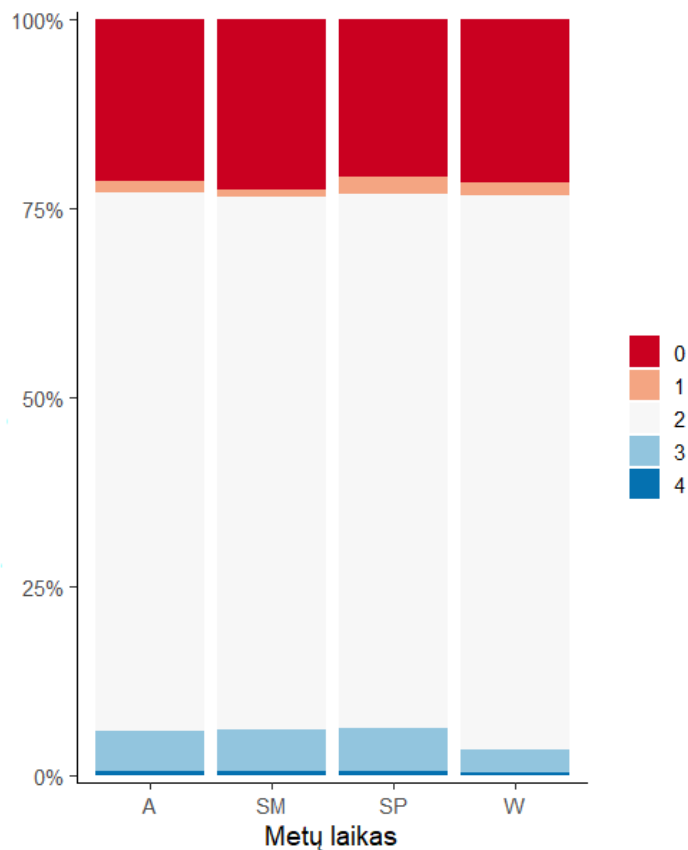
3.1 lentelė. Kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apsivaisinimo tipus.

| 0PN | 1PN | 2PN | 3PN | 4PN |
|----------------|-------------|----------------|--------------|-------------|
| 1070 (21,50 %) | 80 (1,61 %) | 3547 (71,27 %) | 256 (5,14 %) | 24 (0,48 %) |

Vertinant metų laikų ir mėnulio fazių įtaką pagalbinio apvaisinimo metu gautų kiaušialąsčių apsivaisinimo tipui buvo pasirinkta naudoti Chi-kvadrato testą. Metų laikų ir mėnulio fazių skirstymas išliko toks pat. Pastebėta, jog didžiausias procentas neapsivaisinusių kiaušialąsčių buvo vasarą (22,6 %), o mažiausias – pavasarį (20,9 %). Tuo tarpu didžiausias procentas tinkamų apsivaisinimų pastebėtas žiemos (73,4 %), o mažiausias – vasaros metu (70,5 %). Didžiausias procentas kiaušialąsčių su 1 probranduoliu gaunama pavasarį (2,2 %) ir mažiausiai – vasarą (0,8 %), kai tuo tarpu mažiausiai kiaušialąsčių su 3 probranduoliai gauta žiemą atliktų procedūrų metu (3,0 %) (3.8. pav). Pilna lentelė su gautų kiaušialąsčių skaičiumi ir tos reikšmės procentine dalimi pateiktos žemiau (3.2 lentelė). Atlikus Chi-kvadrato testą nustatyta, jog šis skirtumas tarp grupių nėra statistiškai reikšmingas ($p = 0,17$).

3.2 lentelė. Kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apsivaisinimo tipus skirtingais metų laikais.

| | 0PN | 1PN | 2PN | 3PN | 4PN |
|----------------|--------------|------------|---------------|-------------|------------|
| Vasara (SM) | 196 (22,6 %) | 7 (0,8 %) | 612 (70,5 %) | 49 (5,6 %) | 4 (0,5 %) |
| Ruduo (A) | 445 (21,4 %) | 32 (1,5 %) | 1479 (71,1 %) | 113 (5,6 %) | 10 (0,5 %) |
| Žiema (W) | 166 (21,5 %) | 13 (1,7 %) | 566 (73,4 %) | 23 (3,0 %) | 3 (0,6 %) |
| Pavasaris (SP) | 263 (20,9 %) | 28 (2,2 %) | 890 (70,7 %) | 71 (5,6 %) | 7 (0,4 %) |



Pav. 3.8. Kiaušialąsčių pasiskirstymas procentais pagal apvaisinimo tipus skirtingais metų laikais (0 – 0PN, 1 – 1PN, 2 – 2PN, 3 – 3PN, 4 – 4PN, A – rudenio, SM – vasara, SP – pavasaris, W – žiema).

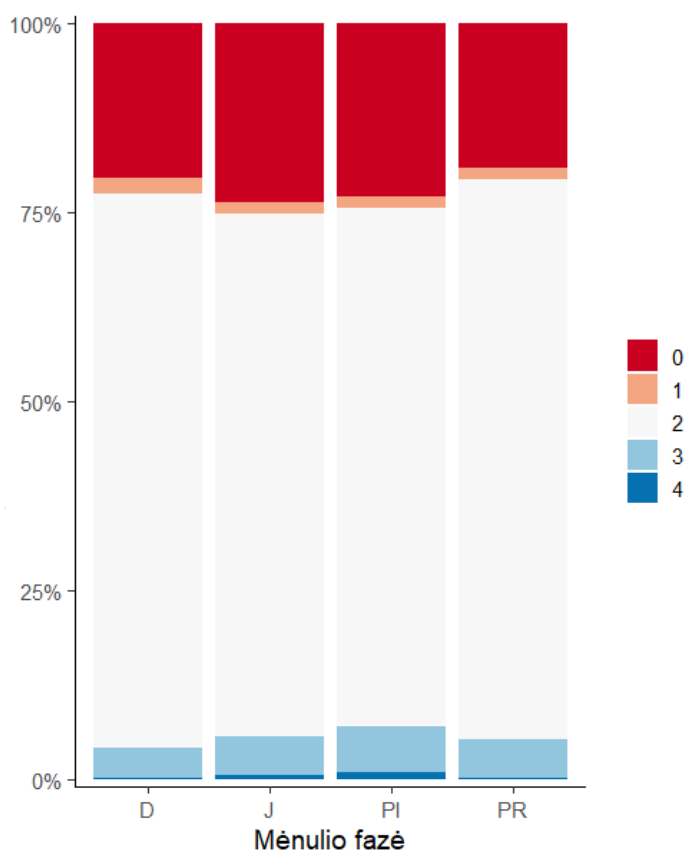
Panašius į mūsų tyrimo rezultatus gavo ir kiti mokslininkai. 2018 m. atlikto tyrimo metu taip pat nenustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp metų laikų ir apvaisinimo dažnio (Xiao et al., 2018). Kroatijoje atliktame tyrime apvaisinimo dažnis taip pat nepriklausė nuo metų laiko, kada atliekama pagalbinio apvaisinimo procedūra (Rienzi et al., 2011). Iš 2005 m. Italijos mokslininkų atlikto tyrimo rezultatų taip pat matyti, jog sezoniškumas neturi įtakos kiaušialąsčių apvaisinimo kokybei (Revelli et al., 2005). Tuo tarpu seniausiam iš šių visų aptartų tyrimų buvo gauti priešingi rezultatai: Izraelio mokslininkai nustatė, kad daugiausia kiaušialąsčių apvaisina žiemą (73,7 %), o mažiausiai – rudenį (65,6 %), ir šis skirtumas tarp skirtingų metų laikų yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) (Rojansky and Lewin, 2000).

Vis dėlto mėnulio įtaka kiaušialąsčių apvaisinimo tipui buvo reikšminga: atlikus chi-kvadrato testą buvo nustatyta, jog skirtumas tarp apvaisinimo tipo esant skirtingai mėnulio fazei yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$). Daugiausia neapvaisinusių kiaušialąsčių gaunama jaunaties metu (23,6 %), mažiausiai – priešpilnio (19,1 %). Tuo tarpu daugiausiai teisingai apvaisinusių kiaušialąsčių gauta esant priešpilnio fazės mėnuliui (74,0 %), mažiausiai – pilnaties (68,5 %). Vienas probranduolys dažniausiai susidaro delčios metu (2,0 %), rečiausiai

– pilnatis (1,4 %), o 3 probranduoliai labiausiai tikėtini pilnatis metu (6,1 %) bei mažiausiai – delčios metu (4,0 %) (3.9. pav.) (3.3 lentelė).

3.3 lentelė. Kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apsivaisinimo tipus esant skirtingai mėnulio fazei.

| | 0PN | 1PN | 2PN | 3PN | 4PN |
|------------------|--------------|------------|---------------|------------|------------|
| Delčia (D) | 216 (20,5 %) | 21 (2,0 %) | 771 (73,3 %) | 42 (4,0 %) | 2 (0,2 %) |
| Jaunatis (J) | 274 (23,6 %) | 18 (1,6 %) | 802 (69,2 %) | 58 (5,0 %) | 7 (0,6 %) |
| Pilnatis (PI) | 308 (23,0 %) | 19 (1,4 %) | 919 (68,5 %) | 82 (6,1 %) | 13 (1,0 %) |
| Priešpilnis (PR) | 272 (19,1 %) | 22 (1,5 %) | 1055 (74,0 %) | 74 (5,2 %) | 2 (0,1 %) |



Pav. 3.9. Kiaušialąsčių pasiskirstymas procentais pagal apsivaisinimo tipus esant skirtingai mėnulio fazei (0 – 0PN, 1 – 1PN, 2 – 2PN, 3 – 3PN, 4 – 4PN, D – delčia, J – jaunatis, PI – pilnatis, PR – priešpilnis).

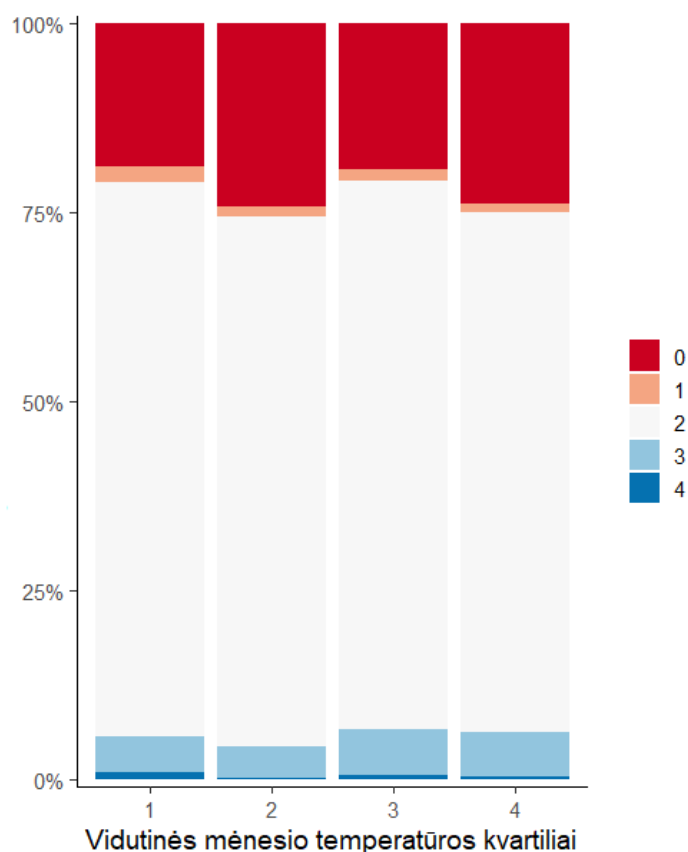
Temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų įtaka kiaušialąstės apsivaisinimo tipui

Atliekant kiaušialąsčių apsivaisinimo tipo pagal vidutinę mėnesio temperatūrą buvo pritaikytas toks pat analizės modelis. Daugiausia kiaušialąsčių neapsivaisino temperatūrai esant

2,8–8,5 °C (24,2 %), o mažiausiai – esant žemesnei nei 2,8 °C temperatūrai (18,9 %). Daugiausia teisingai apvaisinusių kiaušialąsčių gauta esant taip pat žemesnei nei 2,8 °C temperatūrai (73,4 %), o mažiausia – vidutinei mėnesio temperatūrai esant didesnei nei 14,6 °C (68,8 %). 1 probranduolys dažniausiai gautas esant mažesnei nei 2,8 °C temperatūrai (2,1 %), o rečiausiai – daugiau nei 14,6 °C (1,3 %). Tuo tarpu 3 probranduoliai dažniausiai susidarė temperatūrai esant 8,5–4,6 °C temperatūrai (6,2 %), o mažiausiai – esant 2,8–8,5 °C (4,2 %) (3.10. pav.). Atlikus Chi-kvadrato testą nustatyta, jog šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$). Detali lentelė su gautų kiaušialąsčių skaičiumi ir procentinėmis reikšmėmis pateikiama žemiau (3.4 lentelė).

3.4 lentelė. Kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apvaisinimo tipus esant skirtingai vidutinei mėnesio temperatūrai.

| | 0PN | 1PN | 2PN | 3PN | 4PN |
|--------------------|--------------|------------|---------------|------------|------------|
| 1 ($\leq 2,8$ °C) | 285 (18,9 %) | 31 (2,1 %) | 1105 (73,4 %) | 72 (4,8 %) | 13 (0,9 %) |
| 2 ((2,8, 8,5] °C) | 306 (24,2 %) | 18 (1,4 %) | 885 (70,0 %) | 53 (4,2 %) | 2 (0,2 %) |
| 3 ((8,5,14,6] °C) | 197 (19,3 %) | 16 (1,6 %) | 743 (72,6 %) | 62 (6,1 %) | 5 (0,5 %) |
| 4 (>14,6 °C) | 282 (23,8 %) | 15 (1,3 %) | 814 (68,8 %) | 69 (5,8 %) | 4 (0,3 %) |

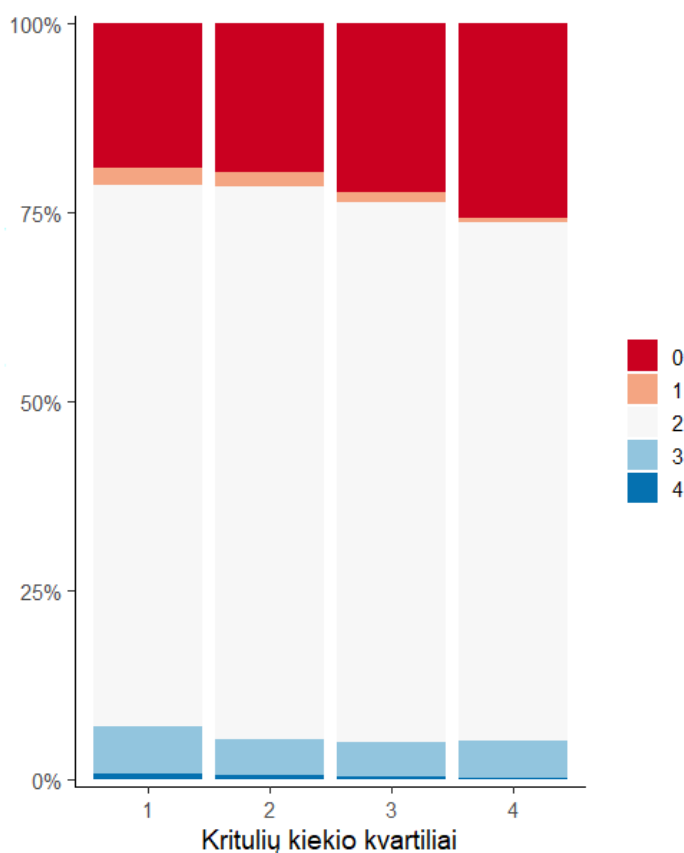


Pav. 3.10. Kiaušialąsčių pasiskirstymas procentais pagal apvaisinimo tipus esant skirtingai vidutinei mėnesio temperatūrai (0 – 0PN, 1 – 1PN, 2 – 2PN, 3 – 3PN, 4 – 4PN; horizontaliai: 1 – $\leq 2,8$ °C, 2 – (2,8, 8,5], 3 – (8,5,14,6] °C, 4 – $>14,6$ °C).

Analizuojant mėnesio kritulių kiekio įtaką kiaušialąsčių apvaisinimo tipui gauta, kad daugiausia kiaušialąsčių neapsivaisina per mėnesį iškrentant daugiau nei 80 mm kritulių (25,7 %)), o mažiausiai – iškrentant mažiau nei 30 mm kritulių (19,2 %). Daugiausiai teisingai apvaisinusių kiaušialąsčių gauta mėnesio krituliams esant 30–60 mm (73,0 %), o mažiausiai – esant daugiau nei 80 mm (68,6 %). Kiaušialąsčių su 1 probranduoliu daugiausiai susidaro per mėnesį iškrentant mažiau nei 30 mm kritulių (2,2 %), o mažiausiai – iškrentant daugiau nei 80 mm kritulių (0,7 %), o tuo tarpu su kiaušialąsčių su 3 probranduoliais daugiausia gauta kai mėnesio krituliai yra mažesni nei 30 mm (6,2 %), o mažiausiai tokių kiaušialąsčių gauta, krituliams esant tarp 60–80 mm (4,5 %) (3.5 lentelė) (3.11. pav). Pasitelkus Chi-kvadrato testą nustatyta, jog ir skirtumai tarp šių grupių yra statistiškai reikšmingi ($p < 0,01$).

3.5 lentelė. Kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apsivaisinimo tipus esant skirtingiems mėnesio kritulių kiekiams.

| | 0PN | 1PN | 2PN | 3PN | 4PN |
|-------------------|--------------|------------|---------------|------------|------------|
| 1 (≤ 30 mm) | 277 (19,2 %) | 32 (2,2 %) | 1036 (71,6 %) | 90 (6,2 %) | 11 (0,8 %) |
| 2 ((30, 60] mm) | 230 (19,6 %) | 23 (2,0 %) | 856 (73,0 %) | 56 (4,8 %) | 7 (0,6 %) |
| 3 ((60, 80] mm) | 287 (22,3 %) | 18 (1,4 %) | 918 (71,4 %) | 58 (4,5 %) | 4 (0,3 %) |
| 4 (> 80 mm) | 276 (25,7 %) | 7 (0,7 %) | 737 (68,6 %) | 72 (4,8 %) | 2 (0,2 %) |



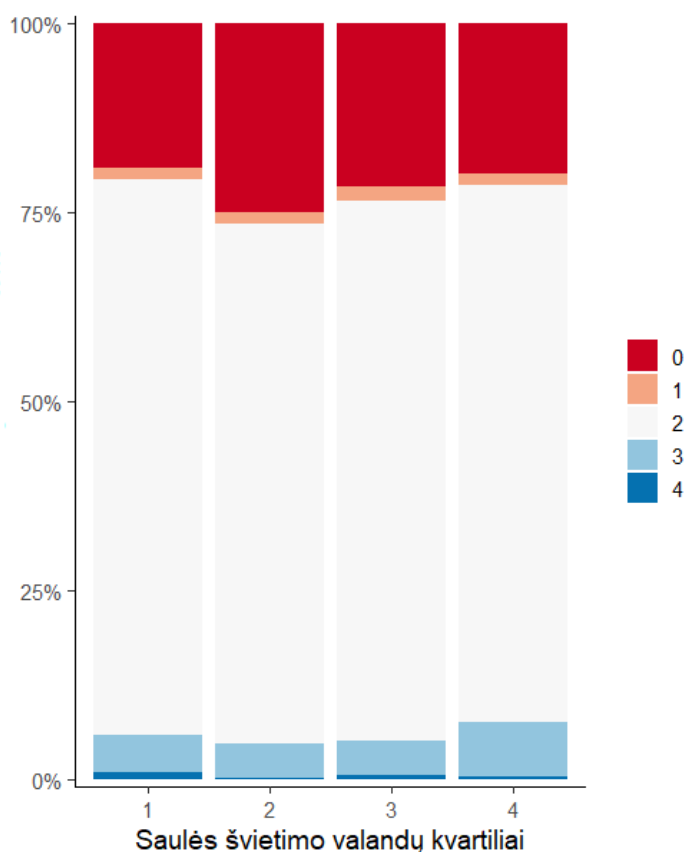
Pav. 3.11. Kiaušialąsčių pasiskirstymas procentais pagal apsivaisinimo tipus esant skirtingai vidutinei mėnesio temperatūrai (0 – 0PN, 1 – 1PN, 2 – 2PN, 3 – 3PN, 4 – 4PN; horizontaliai: 1 – ≤ 30 mm, 2 – (30, 60] mm, 3 – (60, 80] mm, 4 – > 80 mm).

Saulės švietimo valandos per mėnesį yra paskutinis parametras, kurio įtaka kiaušialąsčių apsivaisinimo tipui buvo analizuota. Nustatyta, jog daugiausiai kiaušialąsčių neapsivaisina, kurios gautos pagalbinio apvaisinimo procedūrą atliekant, kai saulė šviečia 30–155 valandas (25,1 %), o mažiausiai – kai šviečia mažiau nei 30 valandų (19,1 %). Teisingai apsivaisinusių kiaušialąsčių pasiskirstymas buvo atvirkštinis: daugiausia jų gauta saulei šviečiant mažiau nei 30 valandų (73,5 %), o mažiausiai – 30–155 valandas (68,9 %). Kiaušialąsčių su 1

probranduoliu daugiausia gauta saulei per mėnesį šviečiant 155–242 val. (1,9 %), o mažiausiai – 30–155 val. (1,4 %). Tuo tarpu 3 probranduoliai dažniausiai susidaro kiaušialąstėse, kurios subrandintos saulei šviečiant daugiau nei 242 valandas per mėnesį (7,1 %), o mažiausiai – 30–155 val. ir 155–242 val. grupėse (4,5 %) (3.12. pav.) (3.6 lentelė). Atliktas Chi-kvadrato testą parodė, jog skirtumai yra statistiškai reikšmingi ($p < 0,01$).

3.6 lentelė. Kiaušialąsčių pasiskirstymas pagal apsivaisinimo tipus esant skirtingam saulės švietimo per mėnesį laikui.

| | 0PN | 1PN | 2PN | 3PN | 4PN |
|---------------------|--------------|------------|---------------|------------|------------|
| 1 (≤ 30 val.) | 247 (19,1 %) | 20 (1,5 %) | 950 (73,5 %) | 65 (5,0 %) | 11 (0,9 %) |
| 2 ((30,155] val.) | 325 (25,1 %) | 18 (1,4 %) | 894 (68,9 %) | 58 (4,5 %) | 2 (0,2 %) |
| 3 ((155,242] val.) | 305 (21,6 %) | 27 (1,9 %) | 1010 (71,5 %) | 64 (4,5 %) | 7 (0,5 %) |
| 4 (> 242 val.) | 193 (19,8 %) | 15 (1,5 %) | 693 (71,1 %) | 69 (7,1 %) | 4 (0,4 %) |



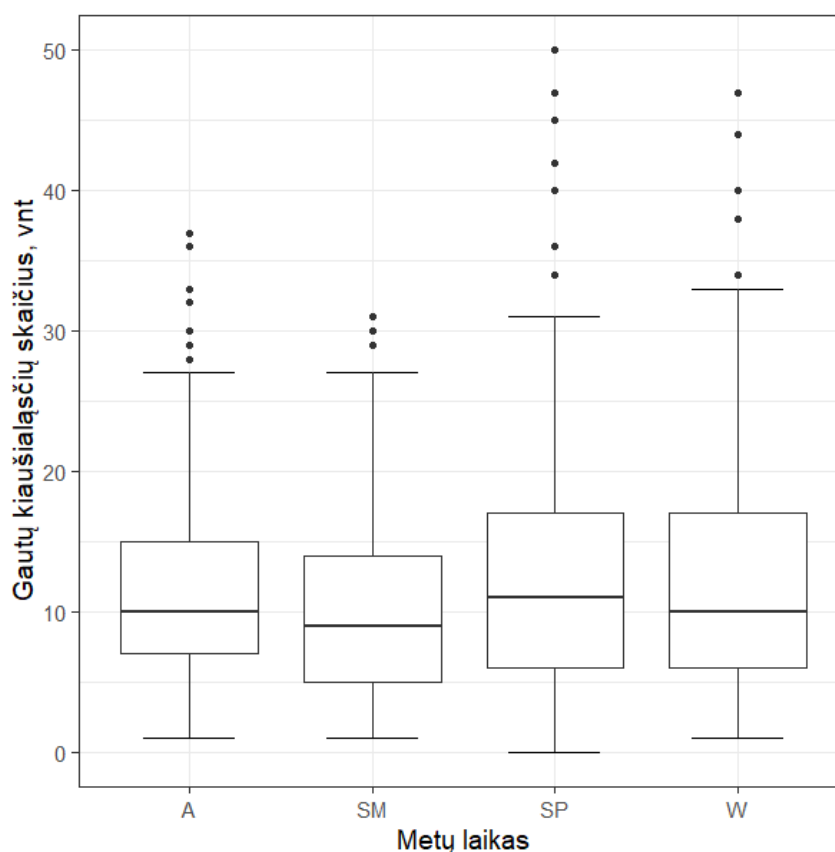
Pav. 3.12. Kiaušialąsčių pasiskirstymas procentais pagal apsivaisinimo tipus esant skirtingai vidutinei mėnesio temperatūrai (0 – 0PN, 1 – 1PN, 2 – 2PN, 3 – 3PN, 4 – 4PN; horizontaliai: 1 – ≤ 30 val., 2 – (30,155] val., 3 – (155,242] val., 4 – > 242 val.).

Jau minėtame 2000 m. Izraelio mokslininkų atliktame tyrime autoriai taip pat nagrinėjo temperatūros, drėgmės ir dienos ilgumo įtaką kiaušialąsčių apsivaisinimui (Rojansky and

Lewin, 2000). Jų gauti rezultatai visiškai priešingi mūsų gautiesiems: nustatyta, jog nei vienas iš šių parametru nedaro įtakos kiaušialąsčių apvaisinimo dažniui ($p > 0,05$).

Metų laikų ir mėnulio fazės įtaka pagalbinio apvaisinimo procedūros metu gautų kiaušialąsčių skaičiui

Vertinant pagalbinio apvaisinimo metu gautų kiaušialąsčių skaičiaus priklausomybę nuo metų laikų ir mėnulio fazės, analizė buvo atliekama su moterų grupe, kurioms procedūra buvo atlikta 2016-2019 m. Imtį sudarė 1016 atliktų IVF arba ICSI procedūrų. Prieš pradėdant statistinę analizę, procedūra, kurios metu susidarė 87 kiaušialąstės, siekiant gauti tikslesnius rezultatus, nebuvo įtrauktos į analizę. Nustatyta, jog pavasarį susidaro $12,86 \pm 9,19$ kiaušialąstės, vasarą – $10,91 \pm 7,33$, rudenį – $11,50 \pm 7,10$, o žiemą – $12,27 \pm 8,45$ kiaušialąstės. Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę išsiaiškinta, jog šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p = 0,04$) (3.13. pav.).

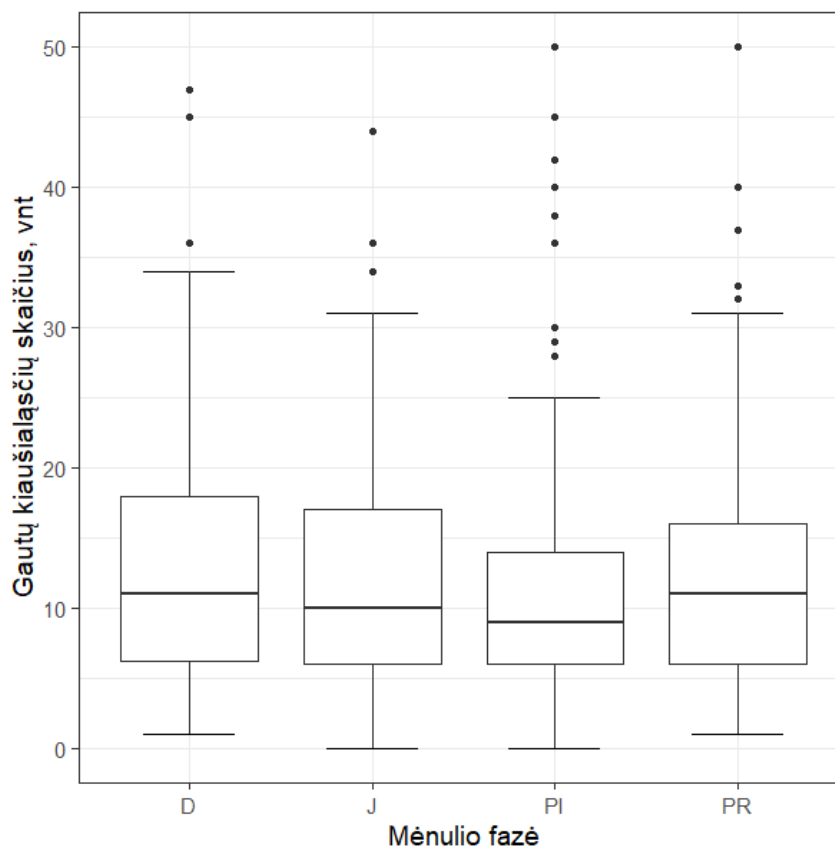


Pav. 3.13. Pagalbinio apvaisinimo procedūros metu gautų kiaušialąsčių skaičius skirtingais metų laikais (A – rudenį, SM – vasarą, SP – pavasarį, W – žiemą).

Kitų tyrėjų atliktame tyrime statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta analizuojant gautų kiaušialąsčių skaičių pagalbinio apvaisinimo procedūrų skirtingais metų laikais (Liu et al., 2019). 2018 m. (Xiao et al., 2018) ir 2011 m. (Rienzi et al., 2011) tyrimuose taip pat

nustatyta, jog subrendusių kiaušialąsčių skaičius statistiškai reikšmingai nesiskiria lyginant tarp sezonų.

Tuo tarpu vertinant mėnulio fazės įtaką pagalbinio apvaisinimo metu gautų kiaušialąsčių skaičiui nustatyta, jog esant jaunaties mėnuliui vidutiniškai subrandinama ir išpunktuojama $11,90 \pm 8,05$ kiaušialąstės, priešpilnio mėnuliui – $11,90 \pm 7,77$, pilnatis mėnuliui – $11,31 \pm 8,19$, o delčios mėnuliui – $12,68 \pm 8,21$ kiaušialąstės. Tačiau atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę nustatyta, jog statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių nėra ($p = 0,30$) (3.14. pav.).



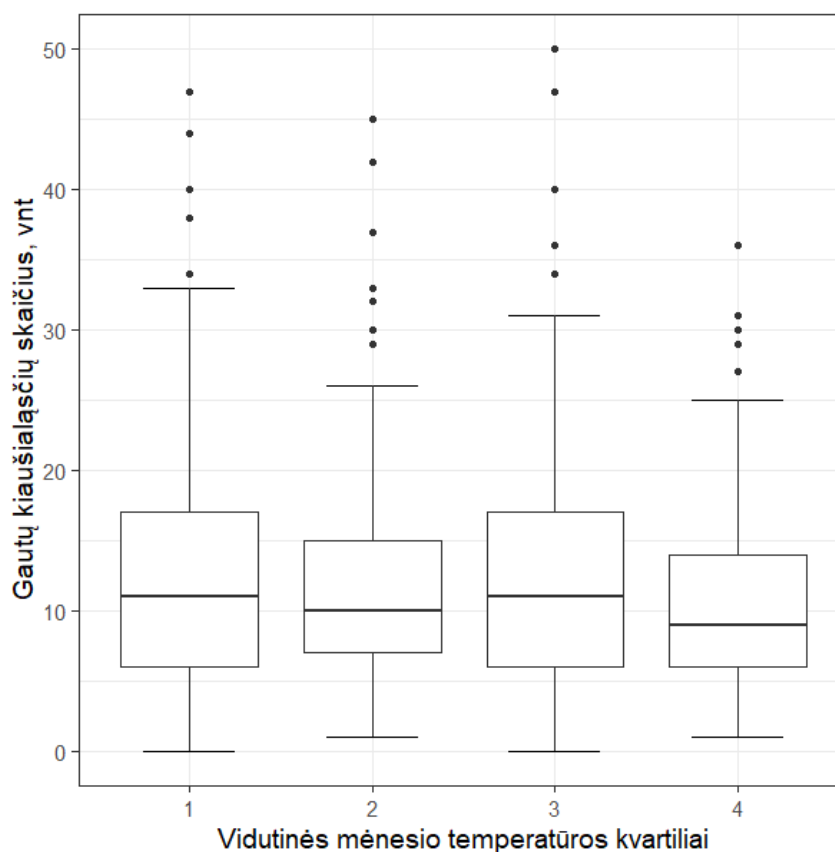
Pav. 3.14. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautų kiaušialąsčių skaičius esant skirtingai mėnulio fazei (D – delčia, J – jaunatis, PI – pilnatis, PR – priešpilnis).

Temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų įtaka pagalbinio apvaisinimo procedūros metu gautų kiaušialąsčių skaičiui

Atliekant gautų kiaušialąsčių skaičiaus priklausomybės nuo vidutinės mėnesio temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų analizę, vėl buvo naudojamas imties skirstymas į keturias grupes pagal kvartilius. Analizuojant vidutinės mėnesio temperatūros įtaką, atliktos procedūros buvo suskirstytos į tokias grupes: 1 – $\leq 2,8$ °C, 2 – $(2,8, 8,5]$ °C, 3 – $(8,5, 13,2]$ °C, 4 – $>13,2$ °C. Skirstant pagal kritulių kiekio per mėnesį kvartilius, grupės atrodė taip: 1 – ≤ 44 mm, 2 – $(44, 62]$ mm, 3 – $(62, 77]$ mm, 4 – >77 mm, o skirstymas į grupes pagal

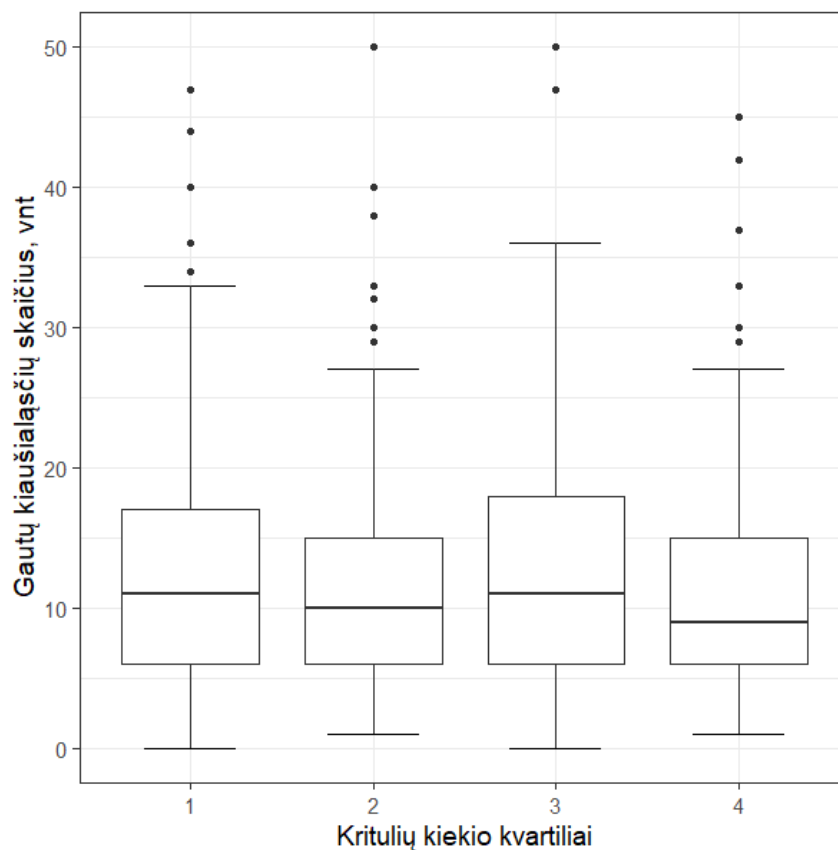
saulės švietimo valandas buvo toks: 1 – ≤ 62 val., 2 – (62,155] val., 3 – (155,242] val., 4 – >242 val.

Vertinant temperatūros įtaką pagalbinio apvaisinimo metu gautų kiaušialąsčių skaičiui nustatyta, jog 1 grupėje vidutiniškai susidarė $12,42 \pm 8,34$ kiaušialąstės, 2 – $11,64 \pm 7,71$, 3 – $12,64 \pm 8,73$ ir 4 – $10,97 \pm 7,27$ kiaušialąstės. Tačiau taip pat, atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę gauta, jog šis skirtumas tarp grupių nėra statistiškai reikšmingas ($p = 0,08$) (3.15. pav.).



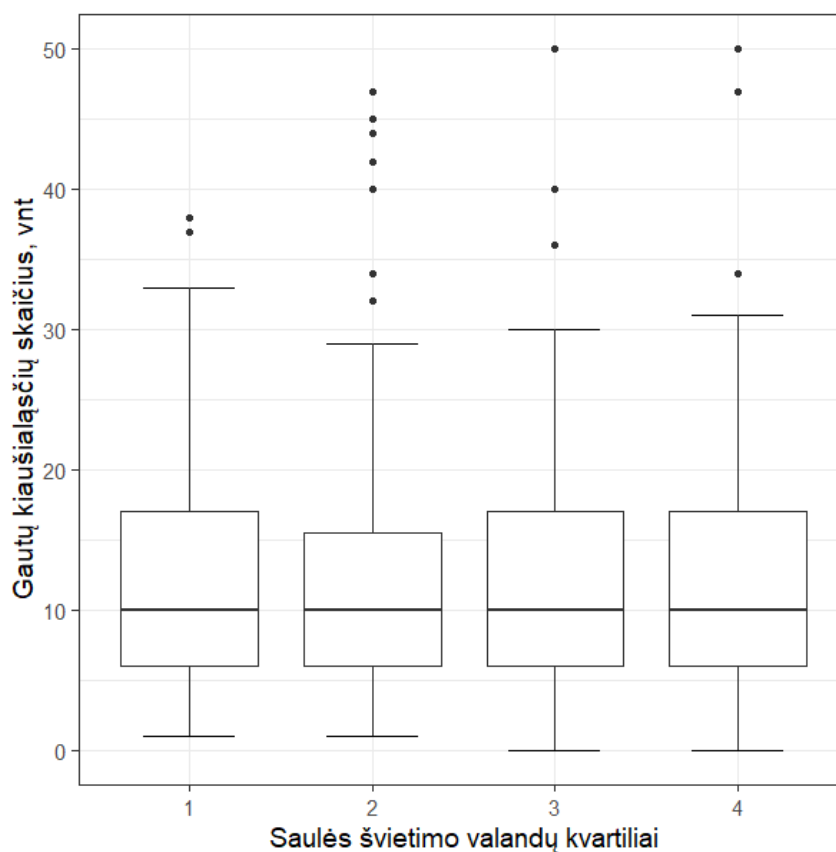
Pav. 3.15. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautų kiaušialąsčių skaičiaus skirtumai atsižvelgiant į vidutinės mėnesio temperatūros kvartilius (1 – $\leq 2,8$ °C, 2 – (2,8, 8,5], 3 – (8,5,13,2] °C, 4 – $>13,2$ °C).

Analizuojant kritulių kiekio įtaką gautų kiaušialąsčių skaičiui nustatyta, kad 1 grupėje vidutiniškai vienos procedūros metu gautos $12,36 \pm 8,31$ kiaušialąstės, 2 grupėje – $11,50 \pm 7,50$, 3 – $12,53 \pm 8,46$ ir 4 grupėje – $11,31 \pm 7,90$ kiaušialąstės. Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę taip pat skirtumas tarp grupių nėra statistiškai reikšmingas ($p = 0,23$) (3.16. pav.).



Pav. 3.16. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautų kiaušialąsčių skaičiaus skirtumai atsižvelgiant į kritulių kiekio per mėnesį kvartilius (1 – ≤ 44 mm, 2 – (44, 62] mm, 3 – (62, 77] mm, 4 – > 77 mm).

Galiausiai siekiant išsiaiškinti, ar saulės švietimo valandos turi įtakos pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautų kiaušialąsčių skaičiui nustatyta, kad 1 grupėje vidutiniškai vienos procedūros metu susidaro $11,94 \pm 7,66$ kiaušialąstės, 2 grupėje – $11,86 \pm 8,30$, 3 – $12,17 \pm 8,05$ ir 4 – $11,73 \pm 8,33$ kiaušialąstės. Pritaikius tą pačią analizę kaip ir prieš tai buvusiuose skaičiavimuose nustatyta, jog ir tarp šių grupių statistiškai reikšmingo skirtumo nėra ($p = 0,95$) (3.17. pav.).

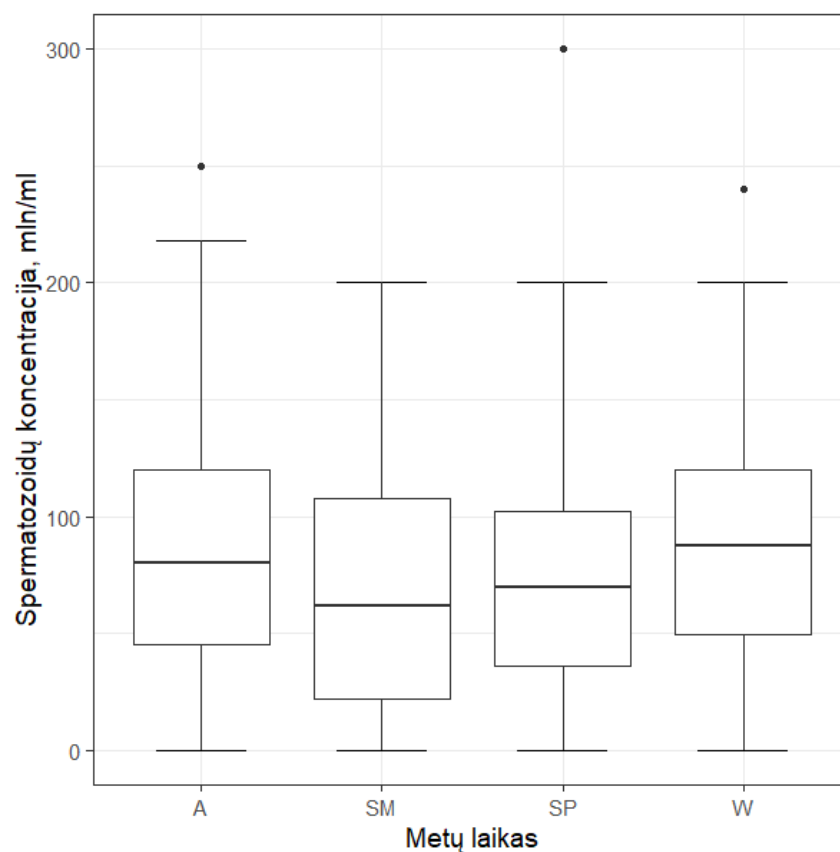


Pav. 3.17. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautų kiaušialąsčių skaičiaus skirtumai atsižvelgiant į saulės švietimo trukmės per mėnesį kvartilius (1 – ≤ 62 val., 2 – (62,155] val., 3 – (155,242] val., 4 – > 242 val.).

Metų laikų ir mėnulio fazės įtaka spermatozoidų koncentracijai

Siekiant įvertinti sezoniškumo ir meteorologinių parametų įtaką spermatozoidų koncentracijai, iš pagalbinio apvaisinimo registro 2016–2019 m. buvo atrinktos tos procedūros, kurias atliekant spermatozoidai buvo įvertinti skaitine verte (į analizę neįtrauktos tos procedūros, kurių metu spermatozoidų koncentracija buvo įvertinta „pavieniai“). Spermatozoidų koncentracija vertinta jų skaičiumi milijonais viename mililitre spermos. Atrinkus, analizė atlikta su 948 procedūrų duomenimis.

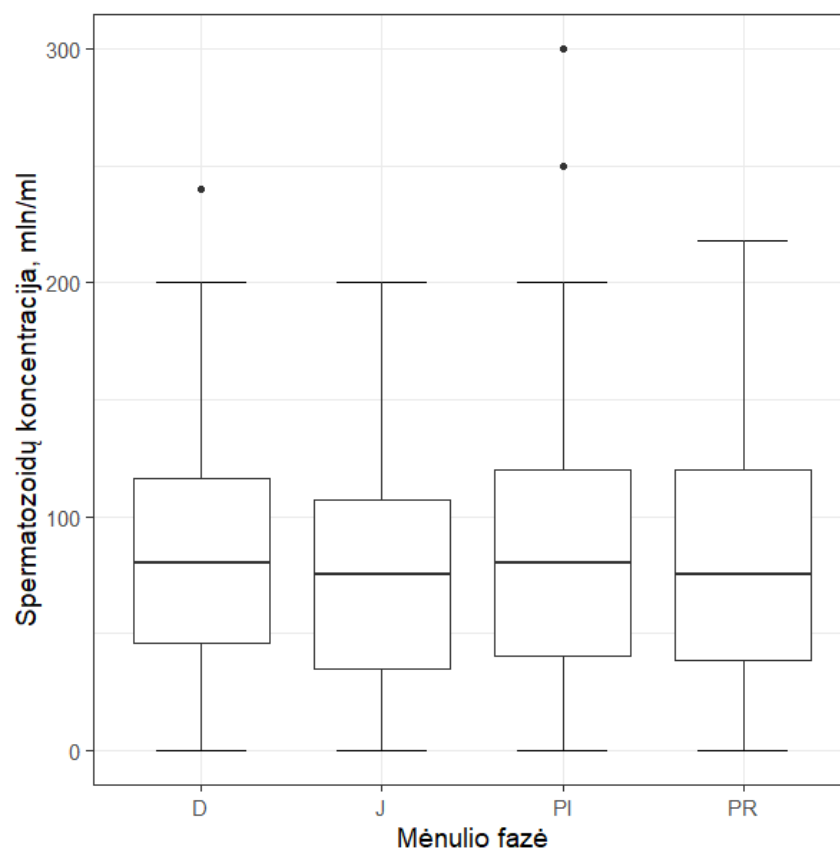
Vertinant metų laikų įtaką spermatozoidų koncentracijai nustatyta, jog pavasarį vidutinė koncentracija yra $76,48 \pm 51,57$ mln/ml, vasarą – $72,77 \pm 56,23$ mln/ml, rudenį – $88,05 \pm 56,05$ mln/ml, ir žiemą – $89,71 \pm 54,84$ mln/ml. Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę nustatyta, jog šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$) (3.18. pav.).



Pav. 3.18. Pagalbinio apvaisinimo procedūros metu gautų spermatozoidų koncentracija skirtingais metų laikais (A – rudenio, SM – vasara, SP – pavasaris, W – žiema).

Panašius rezultatus gavo 2019 m. atlikto tyrimo autoriai. Išanalizavę 26 602 procedūrų jie nustatė, kad spermatozoidų koncentracija skirtingais metų laikais statistiškai reikšmingai skiriasi ir yra didžiausia rudenį (Liu et al., 2019). Kitame tyrime gauti rezultatai rodo, jog didžiausia spermatozoidų koncentracija gaunama procedūras atliekant žiemą, o mažiausia – atliekant vasarą (Mao et al., 2017). Ir 2013 m. tyrime buvo nustatyta, jog spermatozoidų koncentracija statistiškai reikšmingai didesnė yra šaltuoju metų laikotarpiu lyginant su karštuoju ($p = 0,02$) (Levitas et al., 2013). Tokie rezultatai visiškai sutampa su gautais šio tyrimo metu. Buvo tyrimų, kuriuose gauti ir kitokie rezultatai. Pavyzdžiui 2009 m. tyrime gauti rezultatai rodo, jog didžiausia spermatozoidų koncentracija buvo vasarą, o mažiausia – žiemą (Adamopoulos et al., 2009). Dar senesniame Masačusetso universiteto mokslininkų atliktame tyrime gauta, kad didžiausia spermatozoidų koncentracija yra pavasarį, o mažiausia – rudenį (Chen et al., 2004), ir skirtumai abiejuose šiuose eksperimentuose yra statistiškai reikšmingi.

Tuo tarpu vidutinė spermatozoidų koncentracija esant jaunaties mėnuliui yra $76,42 \pm 50,71$ mln/ml, priešpilnio mėnuliui – $83,11 \pm 57,27$ mln/ml, pilnačiai – $85,92 \pm 57,64$ mln/ml, delčios metu – $84,24 \pm 53,04$ mln/ml. Pritaikius vienfaktorinę dispersinę analizę nustatyta, jog skirtumai tarp grupių nėra statistiškai reikšmingi ($p = 0,28$) (3.19. pav.).



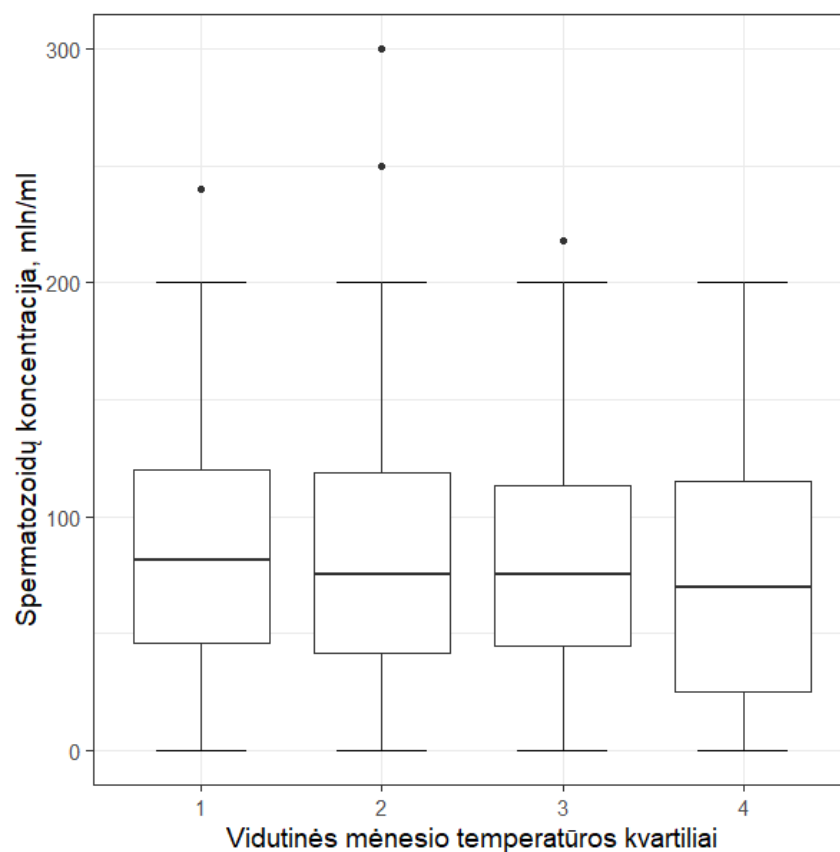
Pav. 3.19. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautos spermatozoidų koncentracijos esant skirtingai mėnulio fazei (D – delčia, J – jaunatis, PI – pilnatis, PR – priešpilis).

Mėnulio fazės įtakos spermatozoidų koncentracijai nerado ir italų mokslininkai savo eksperimente. Jų rezultatai taip pat teigia, jog spermatozoidų koncentracija pasiskirsto tolygiai tarp skirtingų mėnulio fazių (Moretti et al., 2008).

Temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų įtaka spermatozoidų koncentracijai

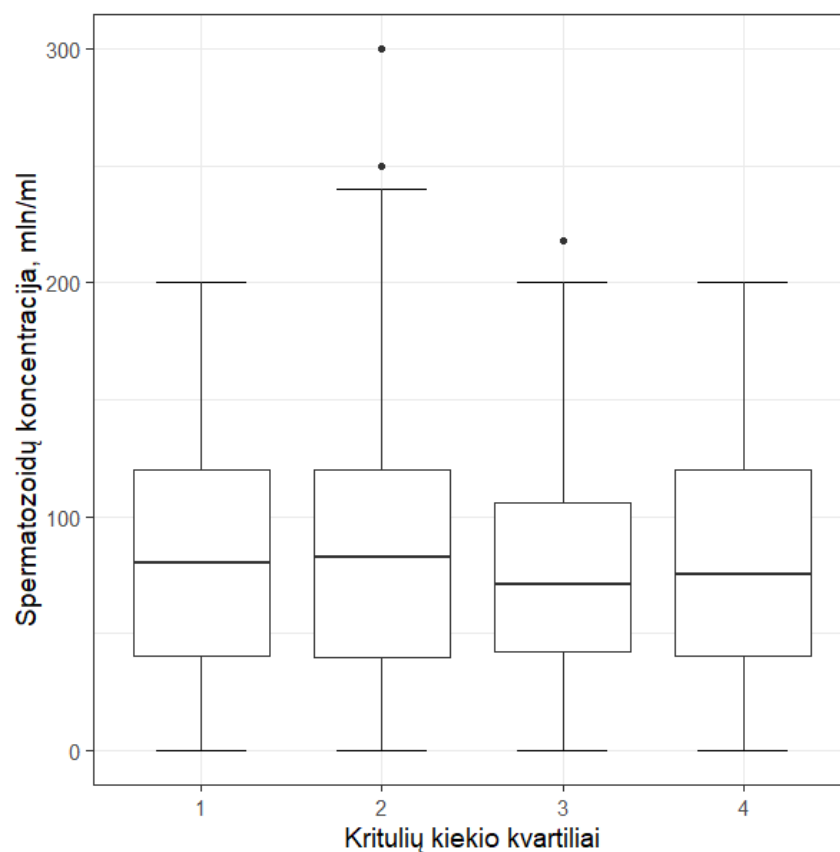
Siekiant nustatyti vidutinės mėnesio temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų daromą įtaką pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gaunamai spermatozoidų koncentracijai, skirstymas kvartiliais išliko toks pat, kaip ir vertinant gautų kiaušialąsčių skaičių.

1 grupėje pagal vidutinę mėnesio temperatūrą vidutinė spermatozoidų koncentracija buvo $87,14 \pm 54,80$ mln/ml, 2 – $86,90 \pm 57,84$ mln/ml, 3 – $80,86 \pm 50,70$ mln/ml, ir 4 – $74,64 \pm 55,48$ mln/ml. Dar kartą pritaikius vienfaktorinę dispersinę analizę pavyko nustatyti, jog šie vidurkių skirtumai tarp grupių yra statistiškai reikšmingi ($p = 0,04$) (3.20. pav.).



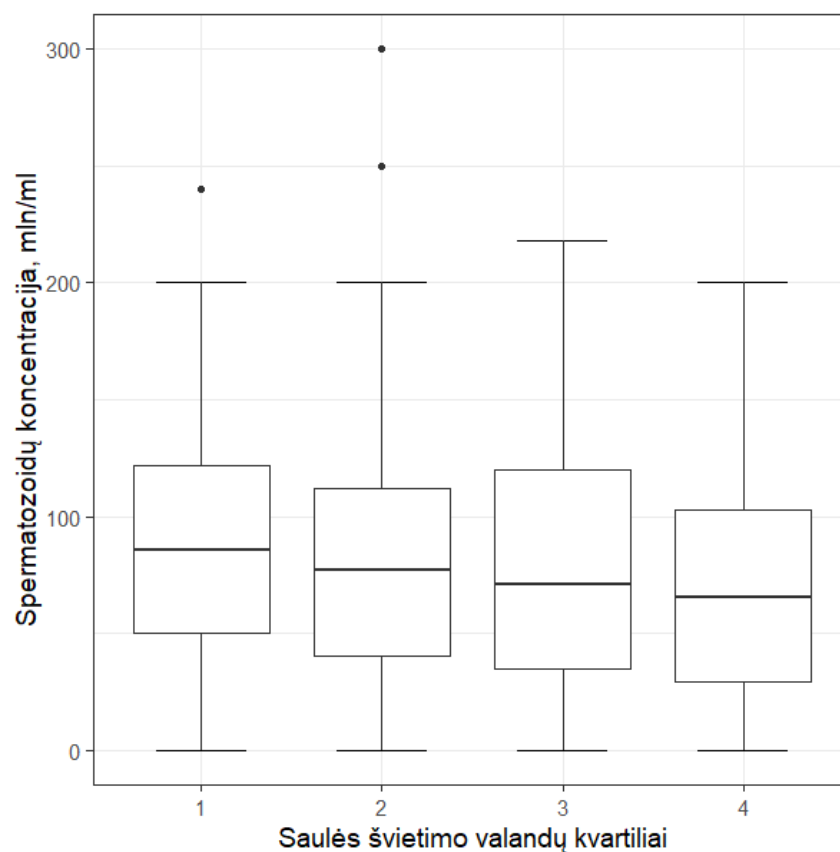
Pav. 3.20. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautos spermatozoidų koncentracijos skirtumai atsižvelgiant į vidutinės mėnesio temperatūros kvartilius (1 – $\leq 2,8$ °C, 2 – (2,8, 8,5], 3 – (8,5,13,2] °C, 4 – $> 13,2$ °C).

Vertinant kritulių kiekio daromą įtaką spermatozoidų koncentracijai gauta, jog vidutinė koncentracija 1 grupėje yra $83,85 \pm 55,28$ mln/ml, 2 – $86,49 \pm 57,01$ mln/ml, 3 – $75,69 \pm 48,11$ mln/ml ir 4 yra $83,91 \pm 58,43$ mln/ml. Vienfaktorinė dispersinė analizė parodė, jog skirtumai tarp aprašytų grupių nėra statistiškai reikšmingi ($p = 0,17$) (3.21. pav.).



Pav. 3.21. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautos spermatozoidų koncentracijos skirtumai atsižvelgiant į kritulių kiekio per mėnesį kvartilius (1 – ≤ 44 mm, 2 – (44, 62] mm, 3 – (62, 77] mm, 4 – > 77 mm).

Galiausiai ieškant sąsajų tarp saulės švietimo valandų ir spermatozoidų koncentracijos nustatyta, kad pirmoje grupėje pagal saulės švietimo trukmę koncentracija yra $91,81 \pm 55,83$ mln/ml, 2 – $83,51 \pm 55,99$ mln/ml, 3 – $79,64 \pm 54,74$ mln/ml, ir 4 – $72,39 \pm 50,82$ mln/ml. Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę išsiaiškinta, jog šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$) (3.22 pav.)



Pav. 3.22. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautos spermatozoidų koncentracijos skirtumai atsižvelgiant į saulės švietimo trukmės per mėnesį kvartilius (1 – ≤ 62 val., 2 – (62,155] val., 3 – (155,242] val., 4 – > 242 val.).

Rekomendacijos poroms ir medicinos specialistams

Viena svarbiausių priežasčių, dėl ko buvo atliktas šis tyrimas – noras gautus rezultatus pritaikyti planuojant VULSK SVC pagalbinio apvaisinimo procedūras, taip gerinant jų kokybę ir efektyvumą. Gauti rezultatai rodo, jog procedūros atlikimas tinkamu metu daro įtaką tam tikriems pagalbinio apvaisinimo procedūrų sėkmę nulemiantiems parametrams.

Vienas svarbiausių rodiklių pagalbinio apvaisinimo procedūros metu yra susidariusių kiaušialąsčių skaičius – kuo daugiau kiaušialąsčių susidaro, tuo didesnė tikimybė, jog tarp jų bus sveika kiaušialąstė, kuri teisingai apvaisins ir vystysis, o vėliau bus tinkama patalpinimui atgal į moters organizmą. Daugiausia kiaušialąsčių procedūros metu yra gaunama pavasarį, todėl viena iš rekomendacijų galėtų būti procedūras atlikti būtent šiuo metų laiku. Kiti parametrai, tokie kaip mėnulio fazė, temperatūra, kritulių kiekis ir saulės švietimo valandos nedaro įtakos gaunamų kiaušialąsčių skaičiui, todėl į juos planuojant procedūrą galima nekreipti didelio dėmesio. Kita vertus, tokių veiksnių įtakos suplanuoti ar išvengti yra ir praktiškai neįmanoma.

Kitas svarbus rodiklis – taisyklingai apvaisinusių kiaušialąsčių dalis, kuri yra taip pat svarbi sėkmingai pagalbinio apvaisinimo procedūros baigčiai. Iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausia teisingai apvaisinusių kiaušialąsčių dalis gaunama procedūras atliekant esant priešpilnio mėnuliui, būnant žemesnei nei 2,8 °C vidutinei mėnesio temperatūrai, iškrentant 30-60 mm kritulių bei saulei per mėnesį šviečiant trumpiau nei 30 valandų. Siekiant padidinti teisingai apvaisinusių kiaušialąsčių skaičių, procedūras reikėtų planuoti būtent tokiu metu: tamsesniuju ir vėsesniuju metų periodais, kas taip pat atitiktų ankstyvo pavasario (ar rudens) sezoną. Nors ir metų laikas tiesioginės įtakos neturi, bet mažiausiai saulės ir šalčiausia metuose būna lapkričio-vasario mėnesiais. Tuo tarpu mažiausiai teisingai apvaisinusių kiaušialąsčių gaunama esant pilnates mėnuliui, vidutinei mėnesio temperatūrai būnant didesnei nei 14,6 °C, iškrentant daugiau nei 80 mm kritulių ir saulei šviečiant tarp 30-155 valandų per mėnesį. Tokie parametrai būdingi vasaros sezonui. Taigi, tokiu metu atliekant procedūras tikėtina, jog teisingai apvaisinusių kiaušialąsčių dalis bus mažesnė.

Gana dažna priežastis, dėl kurios poroms reikalingos pagalbinio apvaisinimo procedūros yra bloga spermatozoidų ir spermos kokybė. Gydytojams nustačius būtent tokią problemą, procedūrą rekomenduojama būtų atlikti vėsesniuju metų periodu (temperatūrai būnant žemesnei nei 2,8 °C ir saulei šviečiant mažiau nei 30 valandų per mėnesį). Būtent tokiu metu spermatozoidų koncentracija spermoje buvo didžiausia, o tai savo ruožtu didina ir sveikų spermatozoidų skaičių bei pagalbinio apvaisinimo procedūros sėkmę. Taip pat, vertinant spermos kokybę, rekomenduotina šių procedūrų neplanuoti šiltuoju metų laiku (vasarą, aukštesnei nei 14,6 °C temperatūrai, saulei šviečiant daugiau nei 242 val. per mėnesį), nes tokiu laiku spermatozoidų koncentracija buvo mažiausia. Tuo tarpu į mėnulio fazę ar kritulių kiekį esant tokioms problemoms atsižvelgti nebūtina, kadangi jie įtakos spermatozoidų koncentracijai, remiantis šio tyrimo rezultatais, neturi.

4. IŠVADOS

1. Atlikus tyrimą nustatyta, vidutinis kiaušialąstės skaidriojo dangalo (ZP) storis buvo $19,28 \pm 2,69 \mu\text{m}$.
2. Kiaušialąsčių ZP storis priklauso nuo metų laiko, mėnulio fazės, vidutinės mėnesio temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų, o kiaušialąstės apvaisinimo tipas priklauso nuo mėnulio fazės, vidutinės temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų.
3. Pagalbinio apvaisinimo procedūrų metu gautų kiaušialąsčių skaičius priklauso tik nuo metų laikų ir nepriklauso nuo kitų nagrinėtų parametrų. Spermatozoidų koncentracija procedūros atlikimo metu priklauso nuo metų laiko, vidutinės mėnesio temperatūros ir saulės švietimo valandų.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
NEUROBIOLOGIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Povilas Maldūnas

Magistro darbas

METŲ LAIKŲ, METEOROLOGINIŲ PARAMETRŲ IR MĖNULIO FAZĖS ĮTAKA
KIAUŠIALAŠTĖS SKAIDRIOJO DANGALO (*ZONA PELLUCIDA*) STORIUI IR
PAGALBINIO APVAISINIMO PROCEDŪRŲ SĖKMEI

SANTRAUKA

Manoma, kad viena iš pagrindinių priežasčių, kodėl neįvyksta apvaisinimas, yra per storas kiaušialąstės skaidriojo dangalo (angl. *zona pellucida*, ZP) sluoksnis. Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti metų laikų, meteorologinių parametrų ir mėnulio fazės įtaką kiaušialąstės ZP storiui, apvaisinimo kokybei pagalbinio apvaisinimo metu gautų kiaušialąsčių skaičiui ir spermatozoidų koncentracijai. Darbo uždaviniai: analizuojant kompiuterinius vaizdus išmatuoti pagalbinio apvaisinimo procedūroms gautų ir apvaisintų kiaušialąsčių skaidriojo dangalo storį, iš pagalbinio apvaisinimo registro surinkti duomenis kiaušialąsčių apvaisinimą, procedūros atlikimo datą, spermatozoidų koncentraciją ir naudojant statistinės analizės metodus, įvertinti metų laikų, mėnulio fazės, vidutinės mėnesio temperatūros, kritulių kiekio, saulės švietimo valandų įtaką skaidriojo dangalo storiui, kiaušialąsčių apvaisinimo kokybei ir spermatozoidų koncentracijai. Storių matavimai nuotraukose buvo atliekami su NIS-Elements F vaizdų apdorojimo programa. Nuotraukų analizė buvo atlikta 4977 kiaušialąstėms. Vidutinis kiaušialąstės ZP storis buvo $19,28 \pm 2,69 \mu\text{m}$. Atskirai išanalizuota ir 1034 procedūrų metu gautų kiaušialąsčių skaičius ir spermatozoidų koncentracija. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad ZP storis statistiškai reikšmingai priklauso nuo metų laiko, mėnulio fazės, temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų ($p < 0,05$). Tuo tarpu kiaušialąstės apvaisinimo tipas priklauso nuo mėnulio fazės, temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų ($p < 0,05$), bet nepriklausė nuo metų laiko. Pagalbinio apvaisinimo metu gautų kiaušialąsčių skaičius priklauso tik nuo metų laikų ($p < 0,05$) ir nepriklauso nuo mėnulio fazės, temperatūros, kritulių kiekio ir saulės švietimo valandų. Spermatozoidų koncentracija atliekant procedūrą priklausė nuo metų laiko, vidutinės mėnesio temperatūros ir saulės švietimo valandų ($p < 0,05$), bet nepriklausė nuo mėnulio fazės ir kritulių kiekio.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCE CENTER
DEPARTMENT OF NEUROBIOLOGY AND BIOPHYSICS

Povilas Maldūnas

Master thesis

INFLUENCE OF SEASONS, METEOROLOGICAL PARAMETERS AND THE
MOON PHASE ON THE THICKNESS OF OOCYTES ZONA PELLUCIDA AND THE
SUCCESS OF ASSISTED REPRODUCTIVE PROCEDURES

SUMMARY

Too thick zona pellucida (ZP) is listed as one of the main reasons of failed oocytes fertilization. The aim of this study was to determine the influence of seasons, meteorological parameters, and lunar phase on the oocyte's zona pellucida thickness, fertilization quality as well as the number of eggs obtained during assisted reproduction procedures and sperm concentration. Objectives: to measure the thickness of zona pellucida obtained and fertilized for assisted reproduction procedures by analyzing computer images, to collect data from the assisted reproduction register about ovarian fertilization, date of procedure, sperm concentration and use statistical analysis methods to estimate seasonal, lunar phase, average temperature, precipitation, and the number of sunshine hours impact on thickness of ZP, the quality of egg fertilization and sperm concentration. Measurements of zona pellucida thickness were made using NIS-Elements F software. Photo analysis was performed on 4977 oocytes. The mean ZP thickness was $19.28 \pm 2.69 \mu\text{m}$. The number of oocytes and the sperm concentration obtained in 1034 procedures were also analyzed separately. Statistical analysis showed that the thickness of the zona pellucida was statistically significant depending on the time of year, lunar phase, temperature, precipitation, and sunshine hours ($p < 0.05$). Meanwhile, the type of fertilization depended on the phase of the moon, temperature, precipitation, and sunshine hours ($p < 0.05$), but did not depend on the season. The number of eggs obtained during assisted reproduction depends only on the seasons ($p < 0.05$) and does not depend on the phase of the moon, the temperature, the amount of precipitation and the sunshine hours. Sperm concentration during the procedure depended on the time of year, average monthly temperature, and sunshine hours ($p < 0.05$), but did not depend on the phase of the moon and the amount of precipitation.

5. LITERATŪRA

- Adamopoulos, D.A., Pappa, A., Billa, E., Nicopoulou, S.C., Koukkou, E., Venaki, E., 2009. Seasonality in sperm parameters in normal men and dyspermic patients on medical intervention. *Andrologia* 41, 118–124. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00899.x>
- Anifandis, G., Messini, C., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., Messinis, I., 2014. Molecular and Cellular Mechanisms of Sperm-Oocyte Interactions Opinions Relative to in Vitro Fertilization (IVF). *IJMS* 15, 12972–12997. <https://doi.org/10.3390/ijms150712972>
- Balaban, B., Ata, B., Isiklar, A., Yakin, K., Urman, B., 2008. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Human Reproduction* 23, 1778–1785. <https://doi.org/10.1093/humrep/den127>
- 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? *Fertility and Sterility* 98, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.015>
- Bedford, J.M., Mock, O.B., Goodman, S.M., 2004. Novelties of conception in insectivorous mammals (Lipotyphla), particularly shrews. *Biological Reviews* 79, 891–909. <https://doi.org/10.1017/S1464793104006529>
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., Wright, G.J., 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508, 483–487. <https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Bjerregaard, B., Lemmen, J.G., Petersen, M.R., Østrup, E., Iversen, L.H., Almstrup, K., Larsson, L.-I., Ziebe, S., 2014. Syncytin-1 and its receptor is present in human gametes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31, 533–539. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0224-1>
- Ceesay, S.M., Prentice, A.M., Cole, T.J., Foord, F., Weaver, L.T., Poskitt, E.M.E., Whitehead, R.G., 1997. Effects on birth weight and perinatal mortality of maternal dietary supplements in rural Gambia: 5 year randomised controlled trial. *General practice* 315, 5.
- Chen, Z., Godfrey-Bailey, L., Schiff, I., Hauser, R., 2004. Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: The Massachusetts General Hospital experience. *J Exp Clin Assist Reprod* 1, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-1050-1-2>
- Chiu, P.C.N., Wong, B.S.T., Chung, M.-K., Lam, K.K.W., Pang, R.T.K., Lee, K.-F., Sumitro, S.B., Gupta, S.K., Yeung, W.S.B., 2008. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 79, 869–877. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069344>
- CHODICK, G., FLASH, S., DEOITCH, Y., SHALEV, V., 2009. Seasonality in Birth Weight: Review of Global Patterns and Potential Causes. *Human Biology* 81, 463–477.
- Currie, J., Schwandt, H., 2013. Within-mother analysis of seasonal patterns in health at birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 12265–12270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307582110>
- Das, S., Dodd, S., Lewis-Jones, D.I., Patel, F.M., Drakeley, A.J., Kingsland, C.R., Gazvani, R., 2005. Do Lunar Phases Affect Conception Rates in Assisted Reproduction? *J Assist Reprod Genet* 22, 15–18. <https://doi.org/10.1007/s10815-005-0815-y>
- De Jonge, C., 2005. Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update* 11, 205–214. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi010>
- Fabryova, K., Simon, M., 2009. Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *General Physiology and Biophysics* 28, 1–7. https://doi.org/10.4149/gpb_2009_01_1

- Friis, H., Gomo, E., Nyazema, N., Ndhlovu, P., Krarup, H., Kæstel, P., Michaelsen, K.F., 2004. Maternal body composition, HIV infection and other predictors of gestation length and birth size in Zimbabwe. *Br J Nutr* 92, 833–840. <https://doi.org/10.1079/BJN20041275>
- Gao, L.-L., Zhou, C.-X., Zhang, X.-L., Liu, P., Jin, Z., Zhu, G.-Y., Ma, Y., Li, J., Yang, Z.-X., Zhang, D., 2017. ZP3 is Required for Germinal Vesicle Breakdown in Mouse Oocyte Meiosis. *Scientific Reports* 7, 41272. <https://doi.org/10.1038/srep41272>
- Green, D.P.L., 1997. Three-dimensional structure of the zona pellucida 10.
- Gupta, S.K., 2015. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *Journal of Reproductive Immunology* 108, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.08.006>
- Ho, K., Wolff, C.A., Suarez, S.S., 2009. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction, Fertility and Development* 21, 345. <https://doi.org/10.1071/RD08183>
- Honda, A., Yamagata, K., Sugiura, S., Watanabe, K., Baba, T., 2002. A Mouse Serine Protease TESP5 Is Selectively Included into Lipid Rafts of Sperm Membrane Presumably as a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 16976–16984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112470200>
- Hughes, M.M., Katz, J., Mullany, L.C., Khatry, S.K., LeClerq, S.C., Darmstadt, G.L., Tielsch, J.M., 2014. Seasonality of birth outcomes in rural Sarlahi District, Nepal: a population-based prospective cohort. *BMC Pregnancy Childbirth* 14, 310. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-310>
- Ignotz, G.G., Lo, M.C., Perez, C.L., Gwathmey, T.M., Suarez, S.S., 2001. Characterization of a Fucose-Binding Protein from Bull Sperm and Seminal Plasma That May Be Responsible for Formation of the Oviductal Sperm Reservoir1. *Biology of Reproduction* 64, 1806–1811. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1806>
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A.M., Okabe, M., 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J. Clin. Invest.* 120, 984–994. <https://doi.org/10.1172/JCI41585>
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., Okabe, M., 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs 434, 5.
- Jégou, A., Ziyat, A., Barraud-Lange, V., Perez, E., Wolf, J.P., Pincet, F., Gourier, C., 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 10946–10951.
- Kirshenbaum, M., Ben-David, A., Zilberberg, E., Elkan-Miller, T., Haas, J., Orvieto, R., 2018. Influence of seasonal variation on in vitro fertilization success. *PLoS ONE* 13, e0199210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199210>
- Kuczynski, W., 2002. Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF. *Human Reproduction* 17, 2423–2427. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.9.2423>
- Law, S.P., 1986. The Regulation of Menstrual Cycle and its Relationship to the Moon. *Acta Obstet Gynecol Scand* 65, 45–48. <https://doi.org/10.3109/00016348609158228>
- Lee, S., Steer, P., Filippi, V., 2006. Seasonal patterns and preterm birth: a systematic review of the literature and an analysis in a London-based cohort. *BJOG: Int J O&G* 113, 1280–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01055.x>
- Levitas, E., Lunenfeld, E., Weisz, N., Friger, M., Har-Vardi, I., 2013. Seasonal variations of human sperm cells among 6455 semen samples: a plausible explanation of a seasonal birth pattern. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 208, 406.e1-406.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.02.010>
- Liu, X., Bai, H., Mol, B.W., Shi, W., Gao, M., Shi, J., 2019. Seasonal variability does not impact in vitro fertilization success. *Sci Rep* 9, 17185. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53919-3>

- Mao, H., Feng, L., Yang, W.-X., 2017. Environmental factors contributed to circannual rhythm of semen quality. *Chronobiology International* 34, 411–425. <https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1280046>
- MATSUDA, S., KAHYO, H., 1998. Geographic Differences in Seasonality of Preterm Births in Japan. *Human Biology* 70, 919–935.
- Montag, M., Schimming, T., Köster, M., Zhou, C., Dorn, C., Rösing, B., van der Ven, H., van der Ven, K., 2008. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reproductive BioMedicine Online* 16, 239–244. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60580-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60580-9)
- Moretti, E., Tallis, V., Trovarelli, S., Gnech, M., Capitani, S., Ponchiatti, R., Collodel, G., 2008. Do lunar phases influence semen parameters? 7.
- Muro, Y., Buffone, M.G., Okabe, M., Gerton, G.L., 2012. Function of the Acrosomal Matrix: Zona Pellucida 3 Receptor (ZP3R/sp56) Is Not Essential for Mouse Fertilization1. *Biology of Reproduction* 86. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095877>
- Murray, S.C., Smith, T.T., 1997. Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation*t. *Fertility and Sterility* 7.
- Rankin, T., Familiari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Drago, J., Westphal, H., Dean, J., 1996. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile 8.
- Rankin, T.L., 2001. Developmental competence of Zp2-null eggs 8.
- Rankin, T.L., Coleman, J.S., Epifano, O., Hoodbhoy, T., Turner, S.G., Castle, P.E., Lee, E., Gore-Langton, R., Dean, J., 2003. Fertility and Taxon-Specific Sperm Binding Persist after Replacement of Mouse Sperm Receptors with Human Homologs. *Developmental Cell* 5, 33–43. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00195-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00195-3)
- Revelli, A., La Sala, G.B., Gennarelli, G., Scatigna, L., Racca, C., Massobrio, M., 2005. Seasonality and human *in vitro* fertilization outcome. *Gynecological Endocrinology* 21, 12–17. <https://doi.org/10.1080/09513590500098307>
- Rienzi, L., Ubaldi, F.M., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K., Greco, E., 2008. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility* 90, 1692–1700. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.024>
- Rienzi, L., Vajta, G., Ubaldi, F., 2011. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update* 17, 34–45. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq029>
- Rojansky, N., Lewin, A., 2000. Seasonal variability in fertilization and embryo quality rates in women undergoing IVF 74, 6.
- Schultz, R.M., Kopf, S., 1989. Egg-Induced Modifications of the Zona Pellucida of Mouse Eggs: Effects of Microinjected Inositol 1,4,5-Trisphosphate 133, 10.
- Shen, Y., Stalf, T., Mehnert, C., Eichenlaub-Ritter, U., Tinneberg, H.-R., 2005. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Human Reproduction* 20, 1596–1606. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh811>
- Shi, S.-L., Yao, G.-D., Jin, H.-X., Song, W.-Y., Zhang, F.-L., Yang, H.-Y., Sun, Y.-P., 2016. Correlation between morphological abnormalities in the human oocyte zona pellucida, fertilization failure and embryonic development 8.
- Shiloh, H., 2004. The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Human Reproduction* 19, 157–159. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh029>
- Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>
- Song, W., Peng, Z., Chen, X., Jin, H., Yao, G., Shi, S., Yang, H., Zhang, X., Sun, Y., 2016. Effects of Vitrification on Outcomes of In Vivo Mature, In Vitro-Mature and Immature

- Human Oocytes. *Cell Physiol Biochem* 38, 2053–2062. <https://doi.org/10.1159/000445564>
- Sousa, M., da Silva, J.T., Silva, J., Cunha, M., Viana, P., Oliveira, E., Sá, R., Soares, C., Oliveira, C., Barros, A., 2013. Embryological, clinical and ultrastructural study of human oocytes presenting indented zona pellucida. *Zygote* 23, 145–157. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000403>
- Tollner, T.L., Yudin, A.I., Treece, C.A., Overstreet, J.W., Cherr, G.N., 2008. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Human Reproduction* 23, 2523–2534. <https://doi.org/10.1093/humrep/den276>
- Weinberg, C.R., Shi, M., DeRoo, L.A., Basso, O., Skjærven, R., 2015. Season and preterm birth in Norway: A cautionary tale. *Int. J. Epidemiol.* 44, 1068–1078. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv100>
- Wolf, J., Armstrong, B., 2012. The Association of Season and Temperature with Adverse Pregnancy Outcome in Two German States, a Time-Series Analysis. *PLoS ONE* 7, e40228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040228>
- Xiao, Y., Wang, M., Liu, K., 2018. The influence of seasonal variations on in vitro fertilization and fresh/frozen embryo transfer: a retrospective study. *Arch Gynecol Obstet* 298, 649–654. <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4843-0>
- Yamaguchi, R., Muro, Y., Isotani, A., Tokuhira, K., Takumi, K., Adham, I., Ikawa, M., Okabe, M., 2009. Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse1. *Biology of Reproduction* 81, 142–146. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074021>
- Yamaguchi, R., Yamagata, K., Ikawa, M., Moss, S.B., Okabe, M., 2006. Aberrant Distribution of ADAM3 in Sperm from Both Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)- and Calmegin (Clgn)-Deficient Mice1. *Biology of Reproduction* 75, 760–766. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.052977>
- Yano, R., Matsuyama, T., Kaneko, T., Kurio, H., Murayama, E., Toshimori, K., Iida, H., 2010. Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Is Associated With the Acrosome Region of Rodent Epididymal Spermatozoa. *Journal of Andrology* 31, 201–214. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.007880>
- Zhao, L., Burkin, H.R., Shi, X., Li, L., Reim, K., Miller, D.J., 2007. Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Developmental Biology* 309, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.009>
- Zimecki, M., 2006. Cykl księżycowy: wpływ na zachowanie ludzi i zwierząt i ich fizjologię. *Postepy Hig Med Dosw* 7.

6. REZULTATŲ SKLAIDA

Gauti rezultatai bus išspausdinti lietuviškame žurnale „Laboratorinė medicina“ pavadinimu „Sezoniškumo įtaka kiaušialąstės skaidriosios srities (*zona pellucida*) storiui ir pagalbinio apvaisinimo procedūrų baigčiai“ (autoriai: Adele Marija Gudlevičiūtė, Povilas Maldūnas, Virginija Paliulytė, Živilė Gudlevičienė). Straipsnis yra priimtas žurnalo redakcijos ir turėtų būti publikuojamas artimiausiame leidime.

Rezultatai „e-poster“ pavidalu šių metų birželio 26 – liepos 1 dienomis bus pristatyti 37-oje kasmetinėje ginekologų konferencijoje „Eshre“ pavadinimu „Seasonality and lunar phase impact zona pellucida thickness while assisted reproductive treatment outcome shown no differences between seasons“ (autoriai: Adele Marija Gudlevičiūtė, Povilas Maldūnas, Gerda Geršvaltaitytė, Virginija Paliulytė, Živilė Gudlevičienė).