

SPERMATOGENEES

Marika Masso
marika.mass@ut.ee

ÕPPEMATERJALID

“BIOLOGIA PRAKTIKUM I” R. Masso, A. Saag, M. Masso

MOODLE / Õppeaine BIOLOGIA / Arengubioloogia praktikumid / Bioloogia PRAKTIKUM I

Online course in embryology for medicine students

developed by the universities of Fribourg, Lausanne and Bern.

Spermatogenesis <http://embryology.ch/en/embryogenese/gametogenesis/spermatogenesis/>

Meeste viljatuse põhjused, 2016 dr K Pomm TÜK Androloogiakeskus Tallinnas

<https://www.virtuaalkliinik.ee/uudised/2016/03/18/meeste-viljatuse-pohjused>

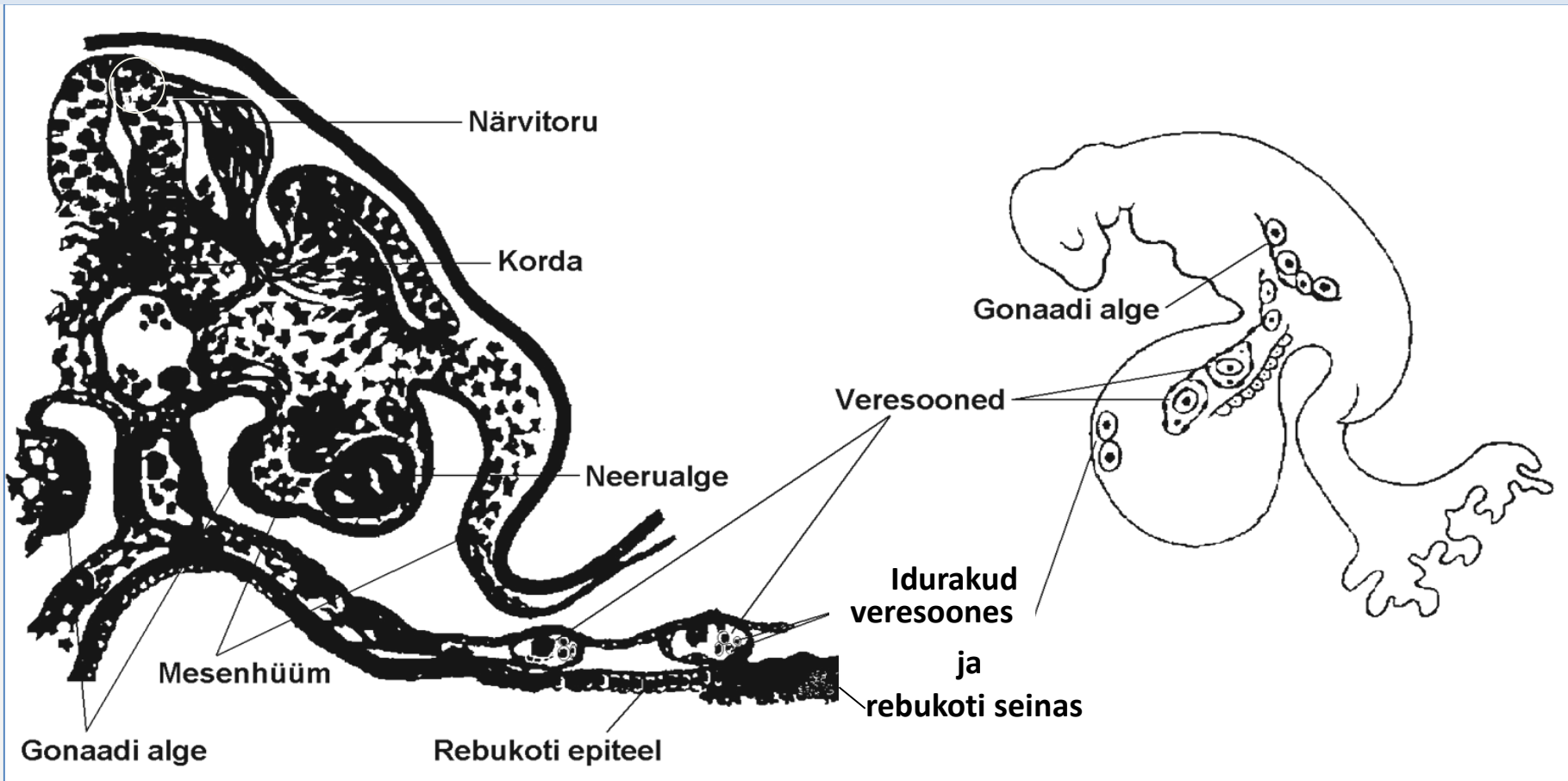
2021 Pohl E et al. *Healthy ageing and spermatogenesis.*

<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/161/4/REP-20-0633.xml>

Pildimaterjali praktiliste tööde juurde - *UWMS Histology Atlas (With Thumbnail Images)*

<http://lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20WISCONSIN/www.medsch.wisc.edu/anatomy/histo/htm/ttoc.htm>

Inimese primordiaalsed sugurakud ehk **idurakud** eristuvad epiblastis 2. arengunädalal; rändavad 3. arengunädalal loote abiorgani rebukoti seina; liiguvad 4.-6. arengunädalal edasi genitaalvalli kus moodustavad gonaadi alge.



2013 Medrano JV et al. Germ Cell Differentiation from Pluripotent Cells.

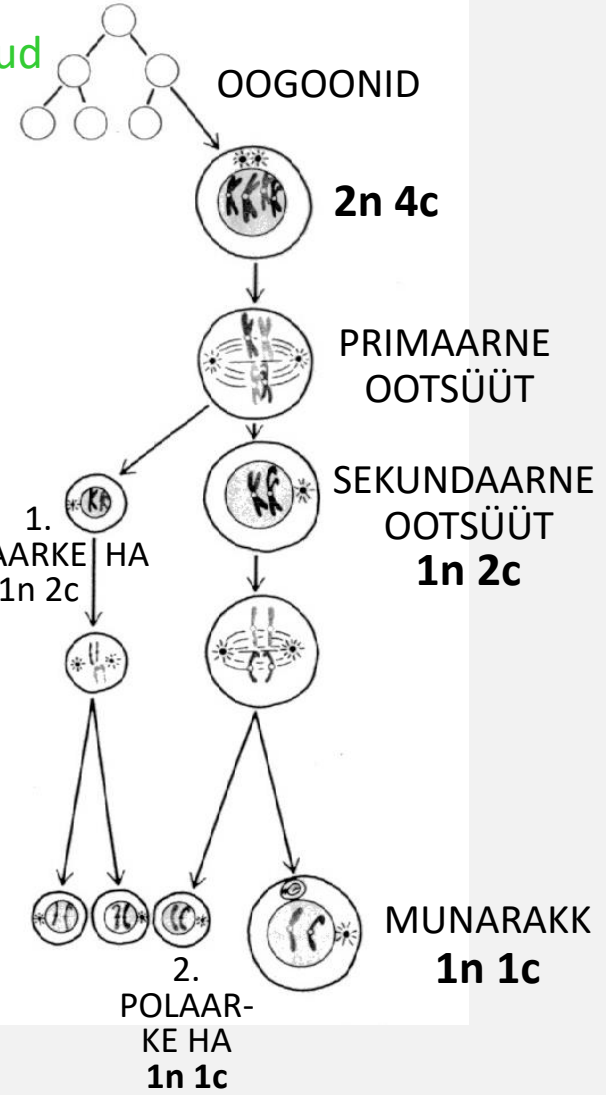
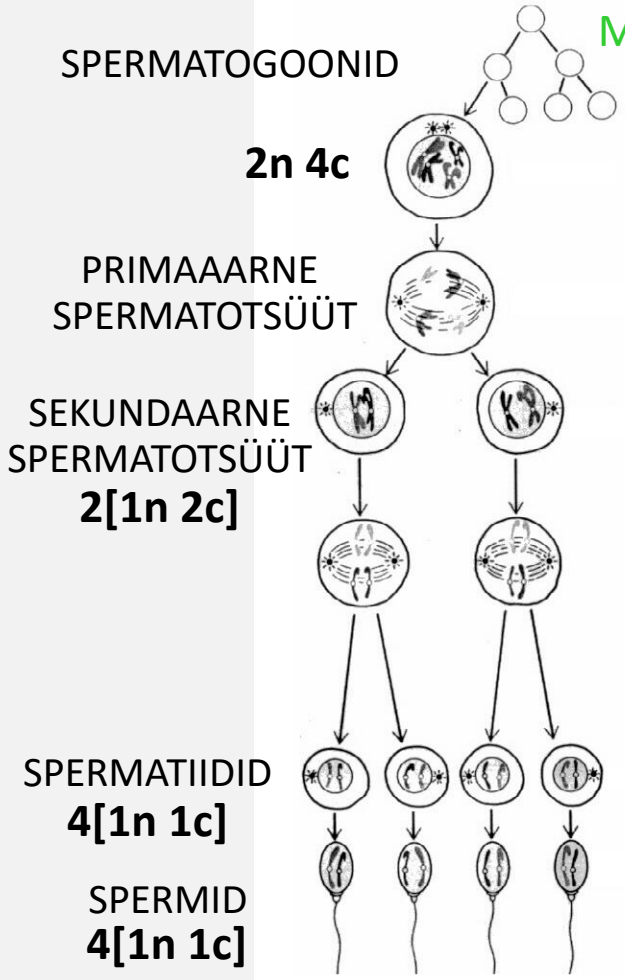
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329632>

Meioos loomses organismis

SPERMATOGENEES

OVOGENEES ehk OOGENEES

Mitootiliselt jagunevad eellasrakud



Meioos I

Meioos II

Vigade teke gametogeneesisil

- Geen- ja kromosoommutatsioonid
- Genoommutatsioonid

KONTROLLPUNKTID:

vigade leidmisel peaks meioos seiskuma

ja rakud suunatama **APOPTOOSI**

Geen- ja kromosoommutatsioonid

DNA-kahjustuse kontrollpunkt – DNA sünteesil tekkivate vigade leidmine ja parandamine (analoogiline interfaasis esinevaga):

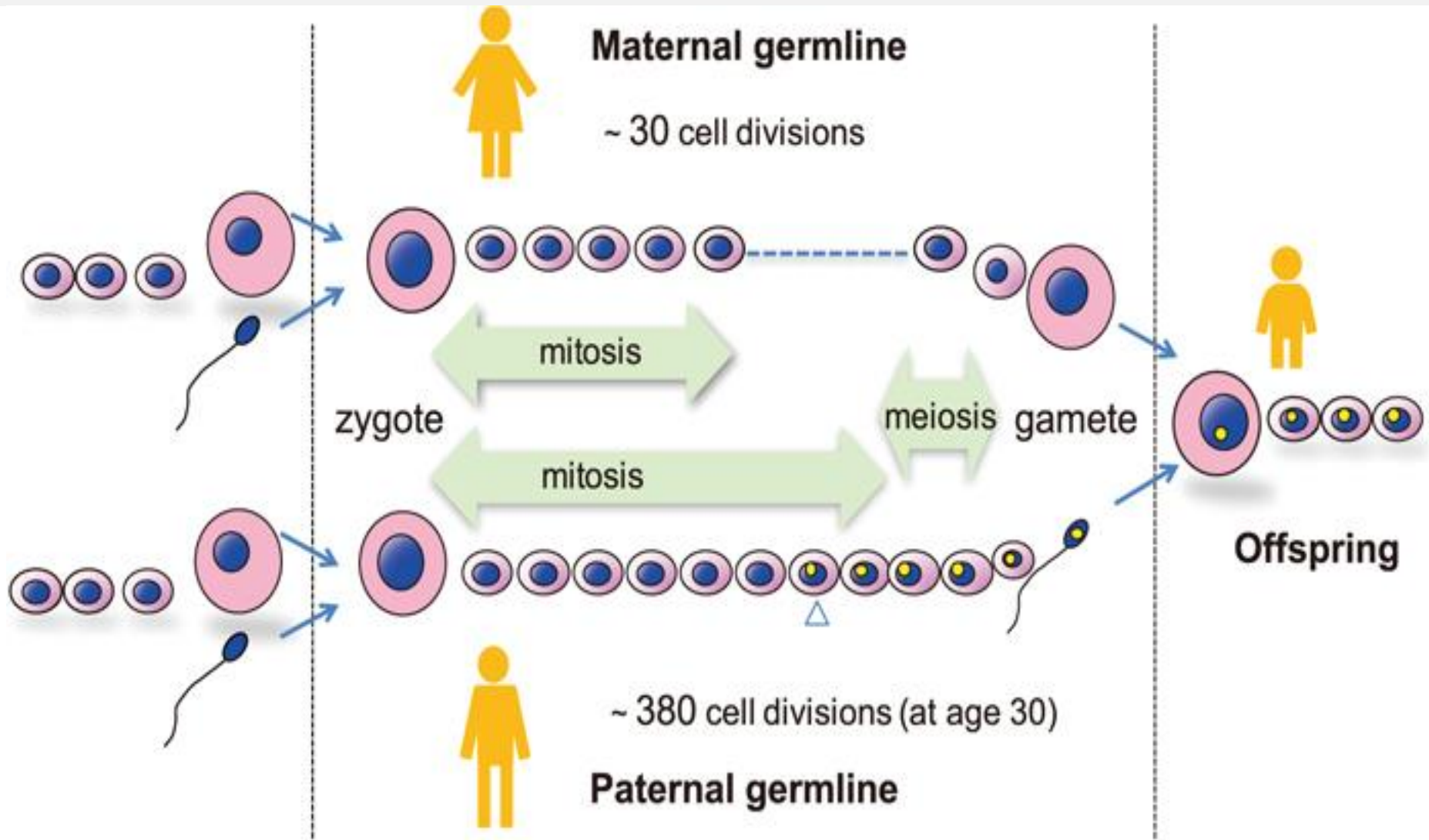
1. DNA replikatsiooni vead, oluline ainult **spermatogeneesis**, kuna spermatogoonid on mitootiliselt aktiivsed kogu eluea;
2. sünaptoemiliste kompleksite moodustumine ja **krossingover**
– protsess sarnaneb DNA reparatsioonile

Kontrollpunkti töö efektiivsus on otseselt seotud vanusega.

Kontrollpunkti töö häirumine põhjustab gameetidel kromosoom-aberratsioone ja/või geenide **de novo mutatsioone**.

De novo mutatsioonide esinemise **sageduse tõus**
on otseselt **seotud isa vanusega** – suureneb oluliselt!

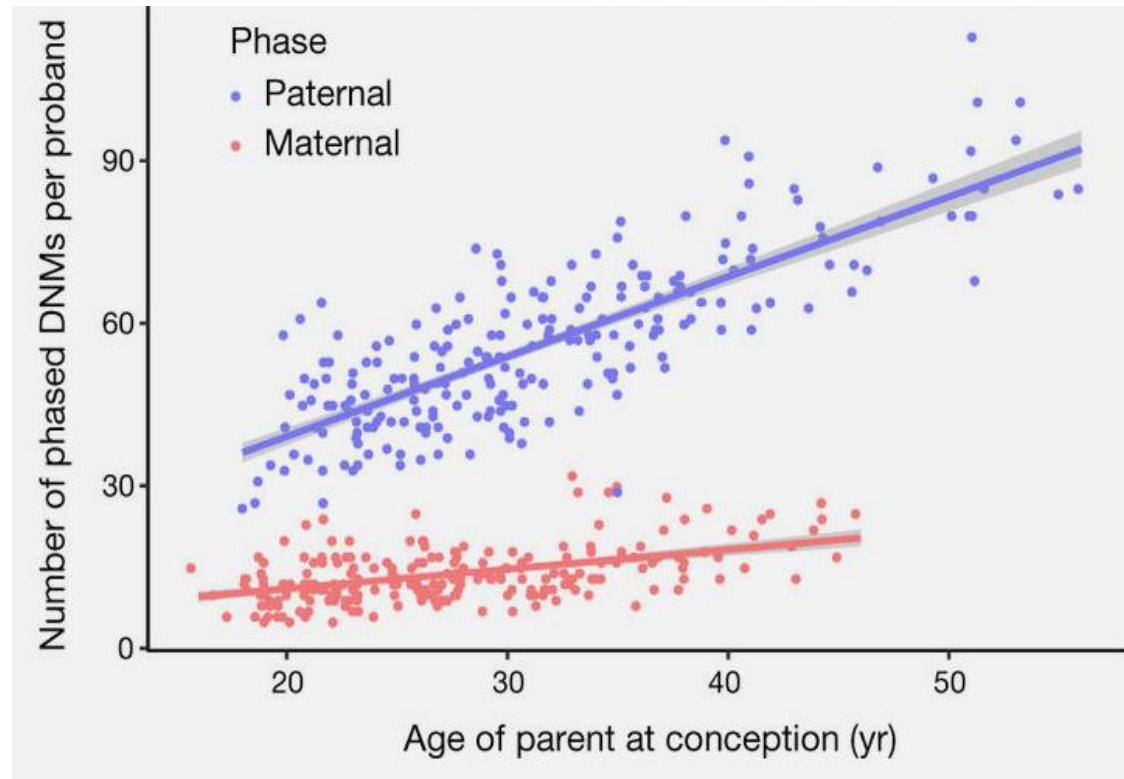
Spontaneous *de novo* germline mutations



* In Fig: A dot in the nucleus represents a *de novo* mutation that arose in a cell of the paternal germline (arrowhead) and was transmitted to the offspring. 2019 Ohno M. [Spontaneous ...](#)

Eakad isad pärandavad mutatsioonikoorma

Recombination rate is higher for women than men. However, men transmit a much higher number of mutations to their children than women.



The **age of the father** is the dominant factor in **determining the number of de novo mutations in the child**. The **germline mutation rate in human males**, especially older males, is generally much **higher than in females**, mainly because **in males there are many more germ-cell divisions** (2000, Crow JF).

Genoommutatsioonid

Vead meioosi I profaasis, ristsiirdel ja kiasmide tekkel, viivad vigadeni meioosi I ja II anafaasis ehk **meioosi lahknemishäireteni**.

Sagedasim tagajärg – ANEUPLOIDSED gameetid.

Aneuploidia – kromosoomide vale arv.

Vigade leidmise eest vastutab käävi kontrollpunkt **SAC**.

- **Vigade leidmisel** peaks meioos seiskuma ja rakud suunatama **APOPTOOSI**.
- Võrreldes oogeneesi meioosiga töötab **spermatogeneesi SAC kontrollpunkt** tunduvalt tõhusamalt.

Krossingoveri vead meioosi I profaasis → kromosoomaberratsioonid sugurakkudes → infertiilsuse üks põhjusi

Kromosoomaberratsioonide sagedus **fertiilse mehe sugurakkudes**:
~10% spermatoosididest kannab kromosoomide struktuuri anomaaliaid
ja 1-2% spermatoosididel on **ANEUPLOIDIA**.

Jälgides meioosi käiku tsütogeneetiliste meetoditega on tuvastatud, et
spermatogeneesi I profaasis **oligo-** ja **azoospermiaga meestel**:

- on **sünaptoneemiliste kompleksite moodustumisel rohkem vigasid**;
- on vähenenud **krossingoverite sagedus** ja moodustunud **kiasmide arv**;
- on **sagenenud aneuploidiate esinemine**.

Aneuploidiate esinemine on kromosoomspetsiifiline! 21., 22. ja X/Y-kromosomid
tunduvalt sagedamini; Seos rekombinatsioonide vähesuse ja/või puudumisega.

Viljatutel meestel on aberratsioonide esinemise sagedus tunduvalt suurem!

Chandley et al., 1975; Sun et al., 2007; Martin, 2008; Templado et al., 2013; Chatziparasidou et al., 2015

2011 Hann et al. Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality?

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297654>

A

1



2



3

B

4



5

C

6



7



8



9



10



11



12

D

13



14



15

E

16



17



18

F

19



20

G

21



22



X

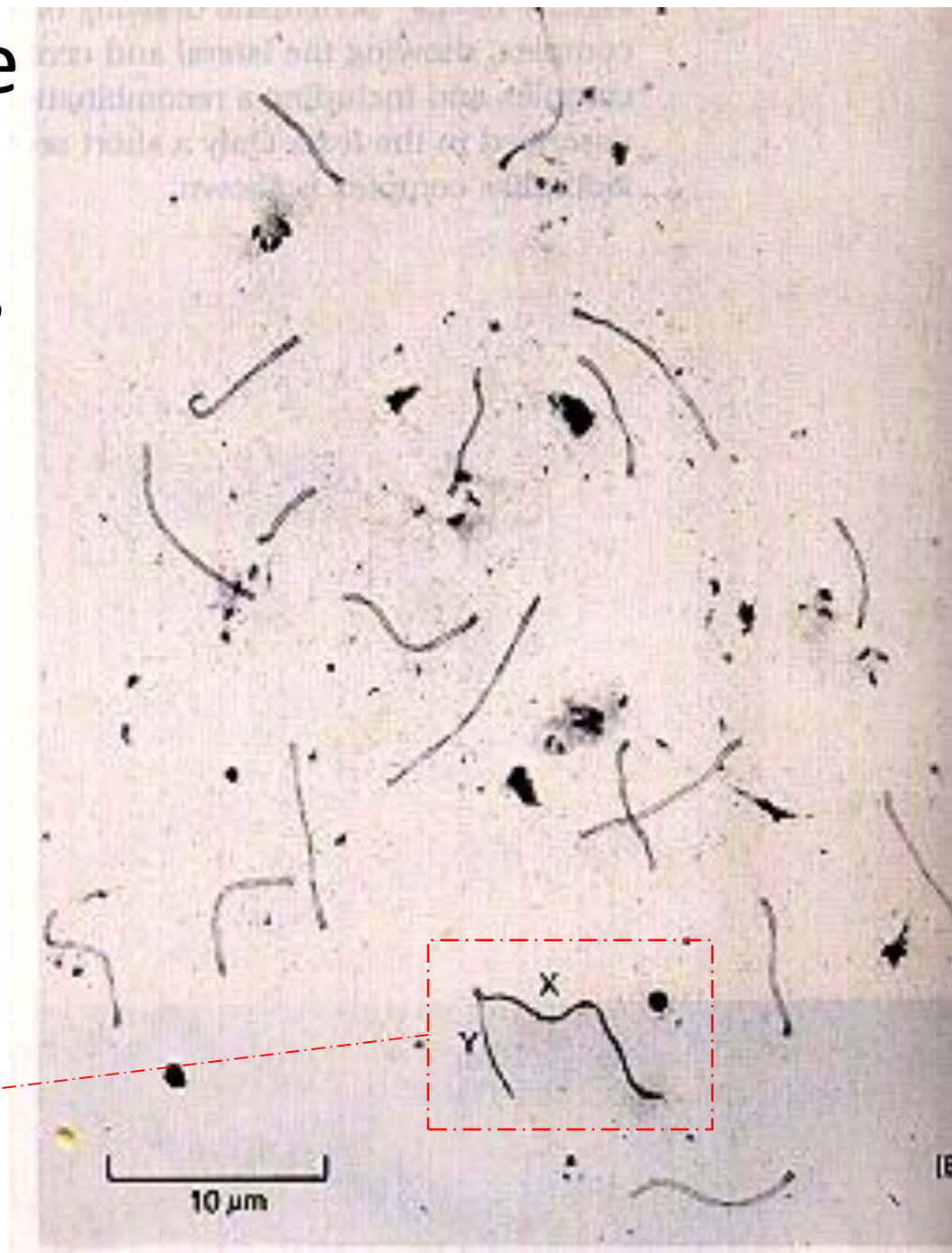


Y

Pahhüteen inimese primaarsetes spermatotsüütides

Meioosi I profaas
kestab meestel ~21 päeva

XY kromosoomid sünaptsises



Spermatogenesis in mice, X ja Y kromosoomid meiosis

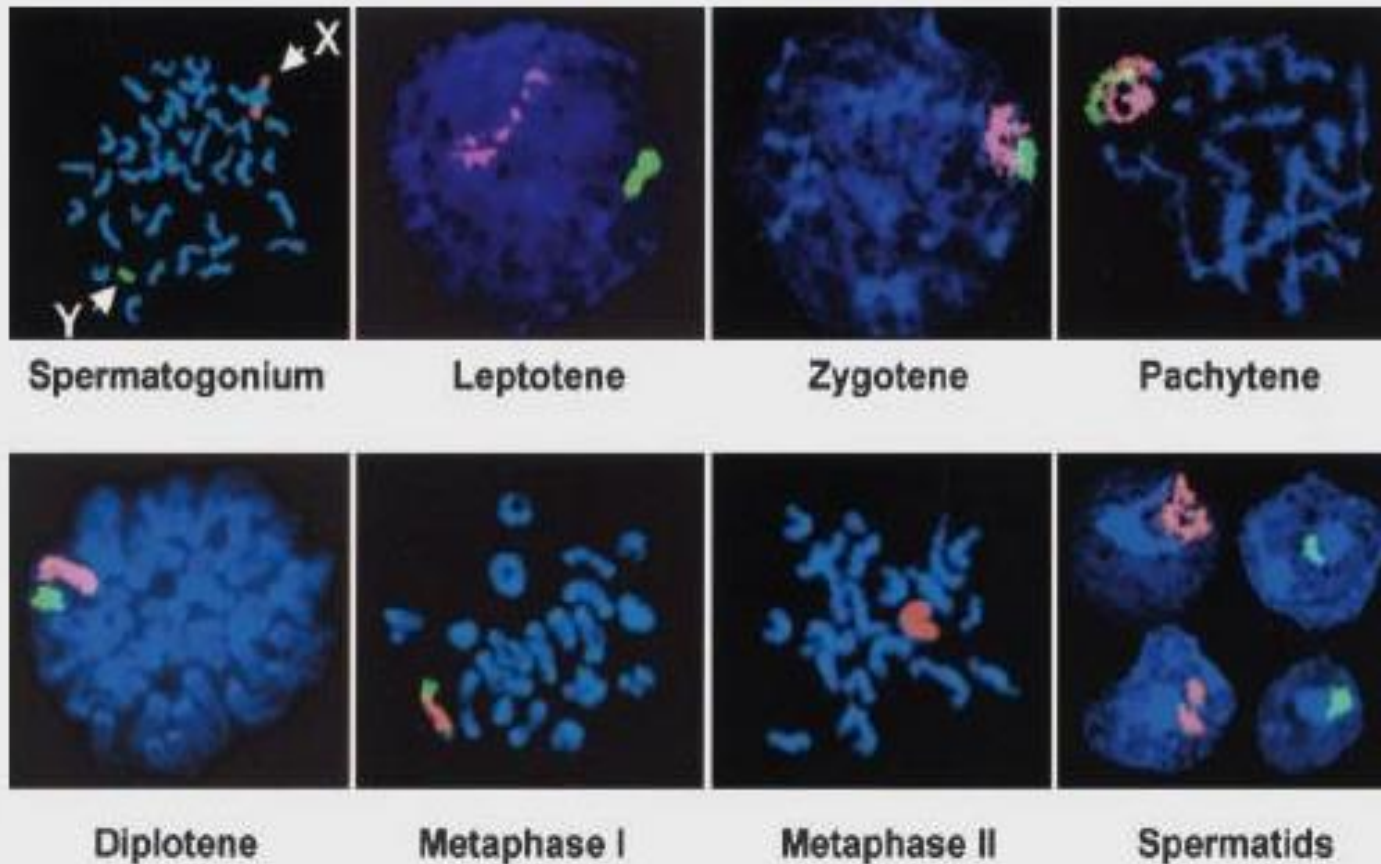
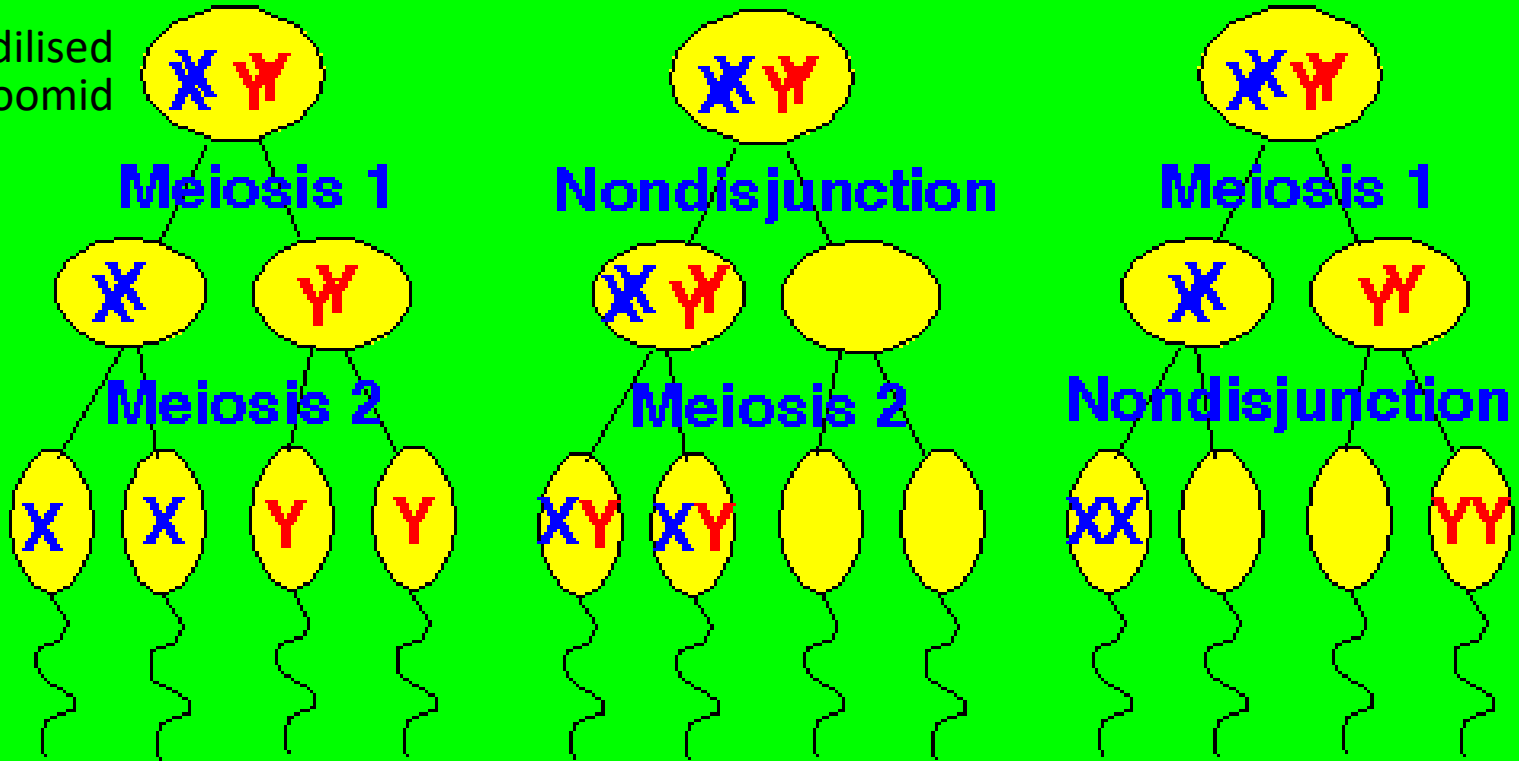


Fig. 1. Stages of spermatogenesis showing the X and Y chromosomes. Chromosomal DNA (blue) is stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Sex chromosomes are shown with DNA whole-chromosome paints for X (pink) and Y (green). The X and Y chromosomes pair at their pseudoautosomal regions to form the sex body at pachytene. After the first meiotic division (metaphase I), the X and Y chromosomes are in separate secondary spermatocytes (metaphase II). Four spermatids are formed from each spermatogonium. The duration of spermatogenesis, from spermatogonia to mature sperm, is \approx 14–26 days in mice and 64–74 days in humans (1).

Meioosi lahknemisvead spermatogeneesi ajal

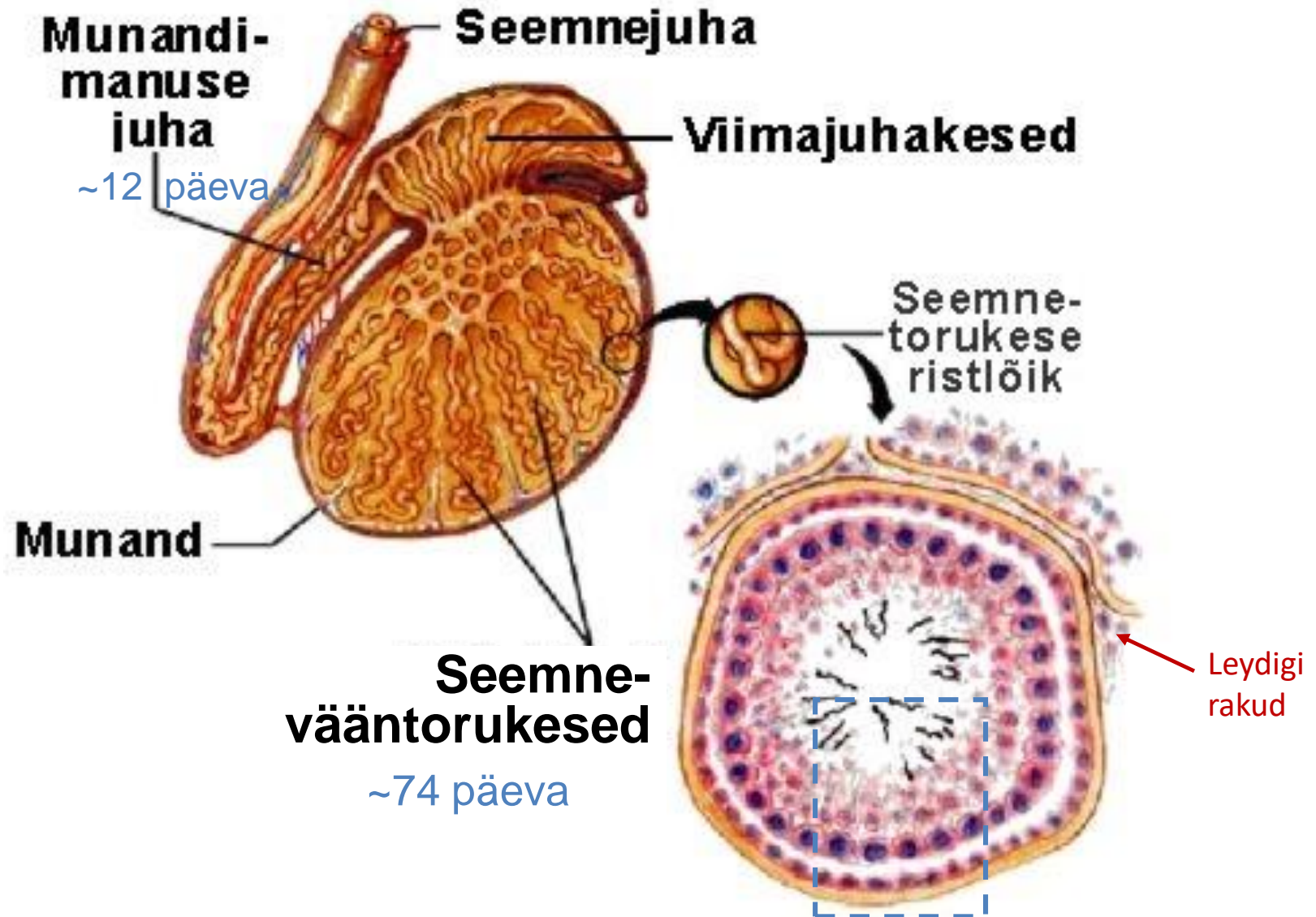
HETEROSOOMIDEL ehk SUGUKROMOSOOMIDEL

Kahekromatiidilised heterosoomid

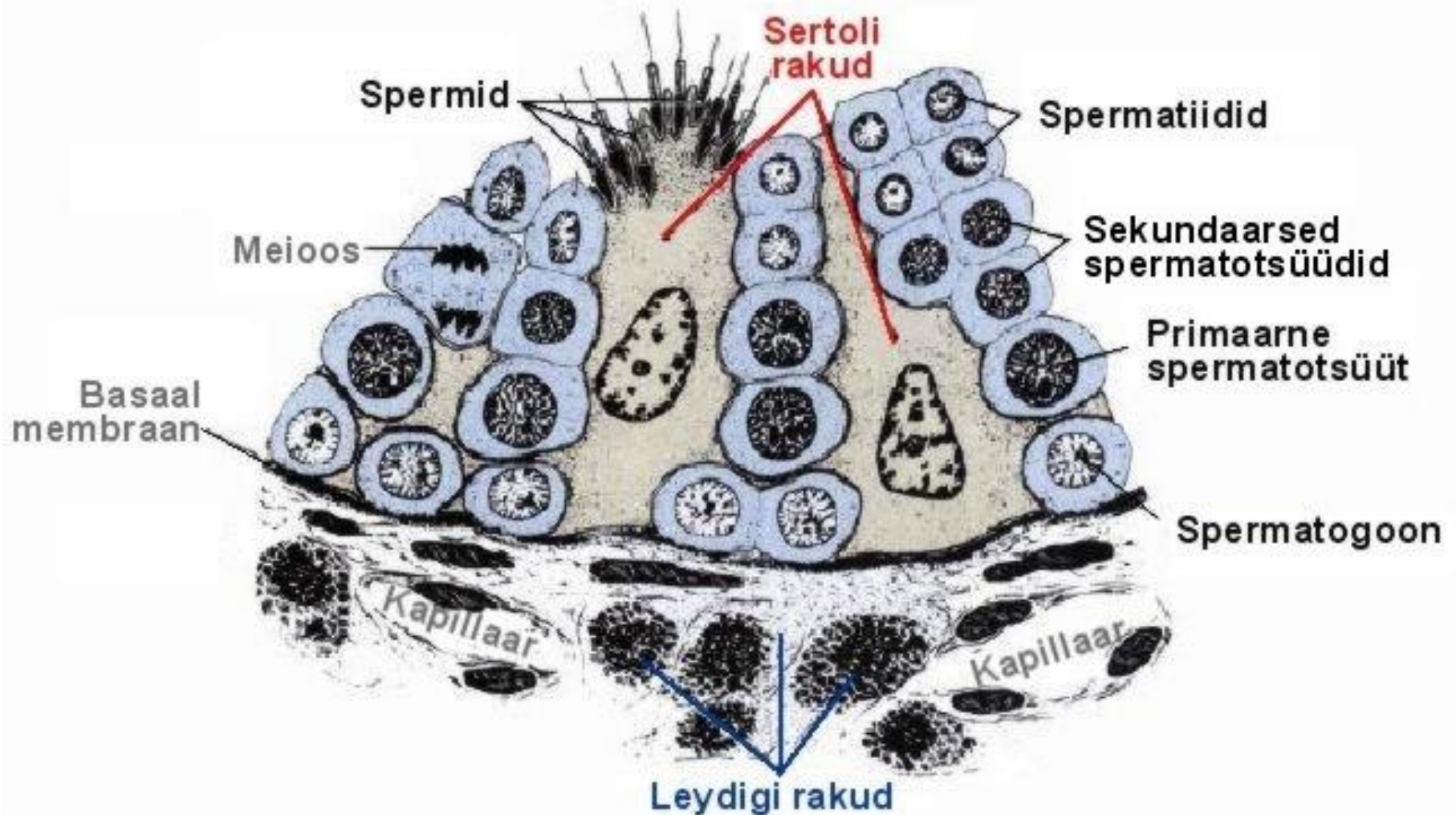


$Y + X = XY \Rightarrow 46, XY$ normaalne mees
 $XY + X = XXY \Rightarrow 47, XXY$ Klinefelter mees
 $YY + X = XYY \Rightarrow 47, XYY$ sündroomiga mees

Spermatogeneees



Sektor seemnevääntorukesest

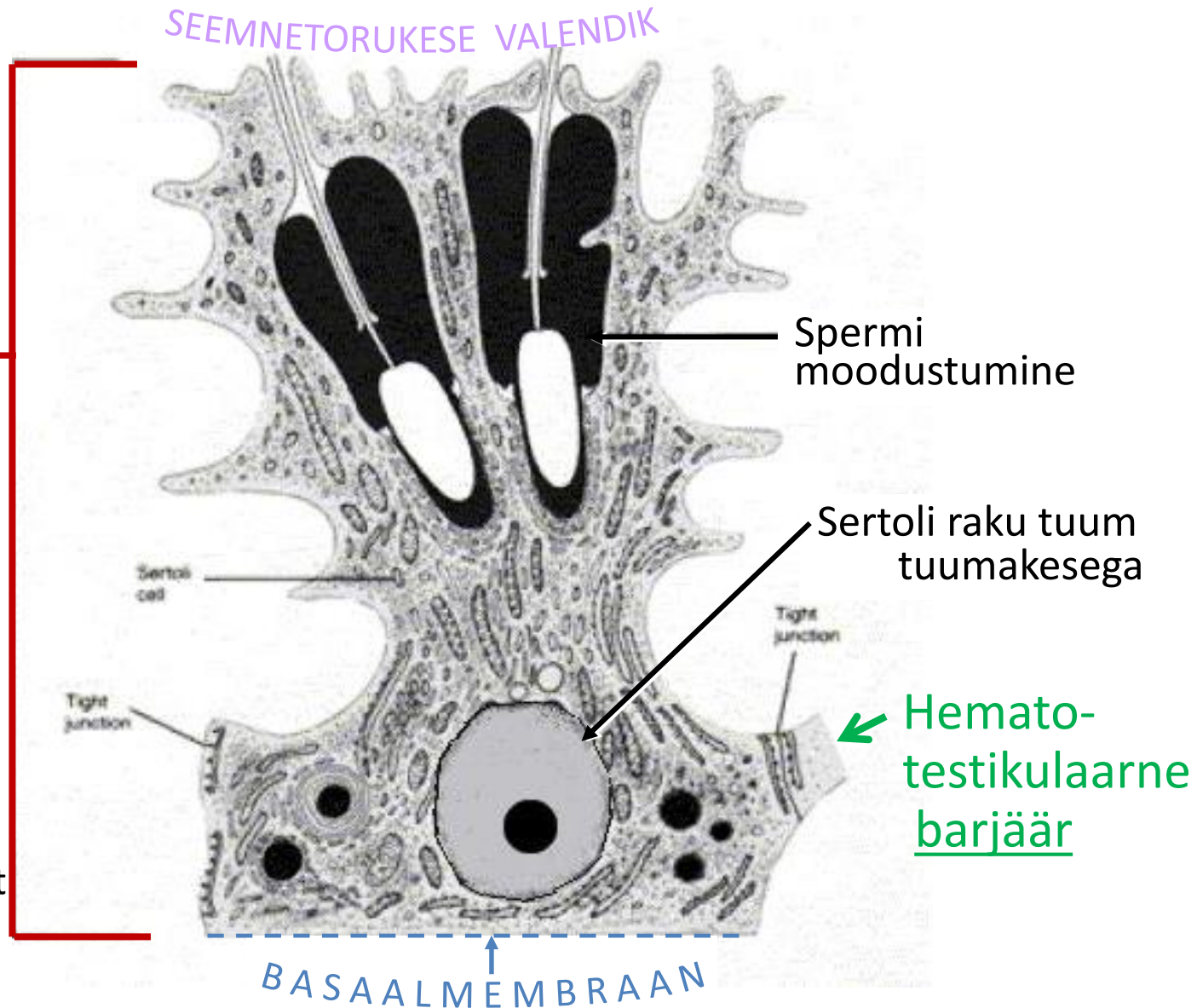


Sertoli raku ehitus

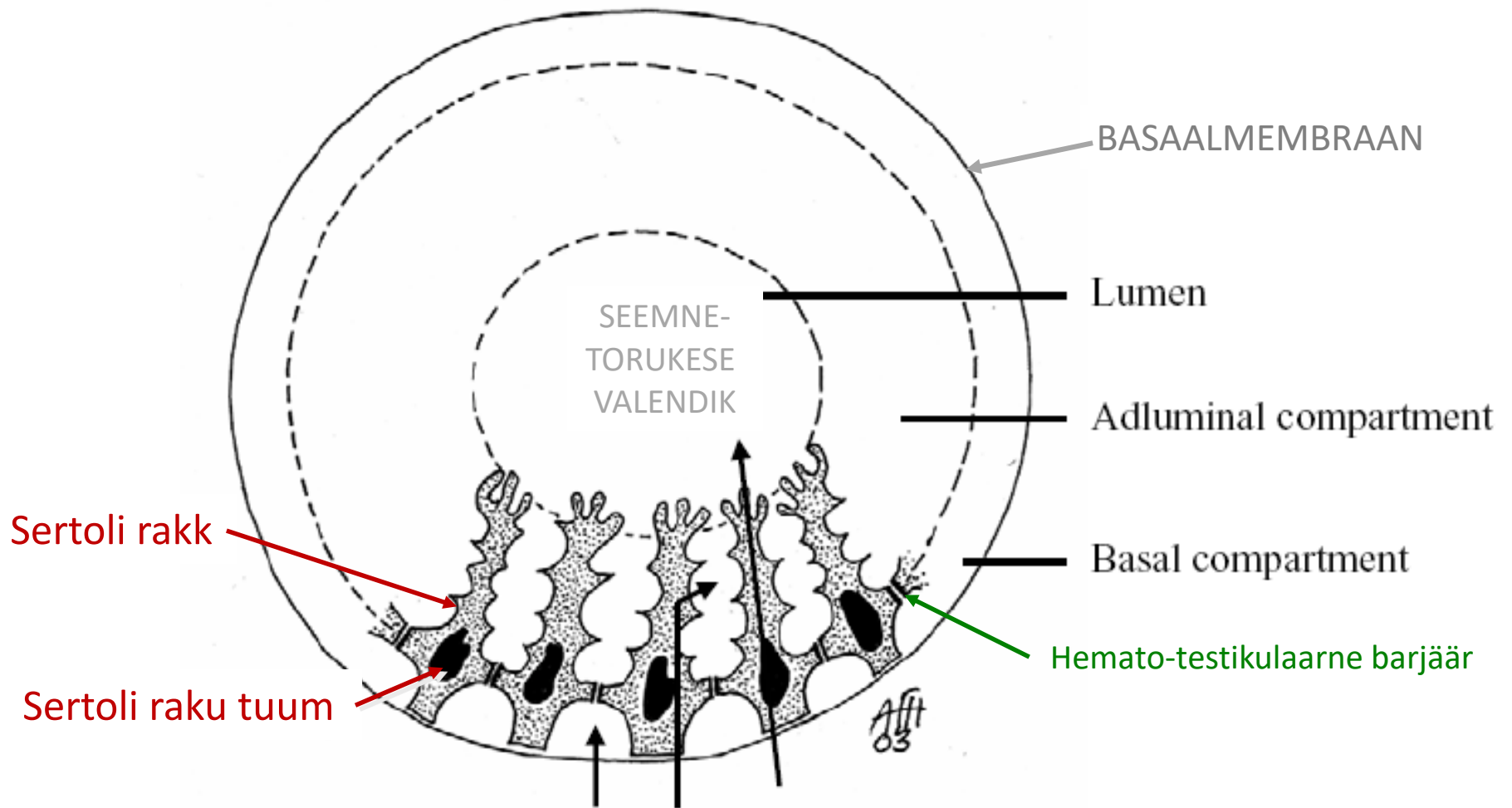
Sertoli rakk

Ülesandeid:

- toetav
- alimentaarne
- ekskretoorne:
anti-Mülleri hormoon,
inhibiin, aktiviinid,
androgeene siduv valk jt
NB! fetaalsel ja
reproduktiivsel
perioodil erinev!

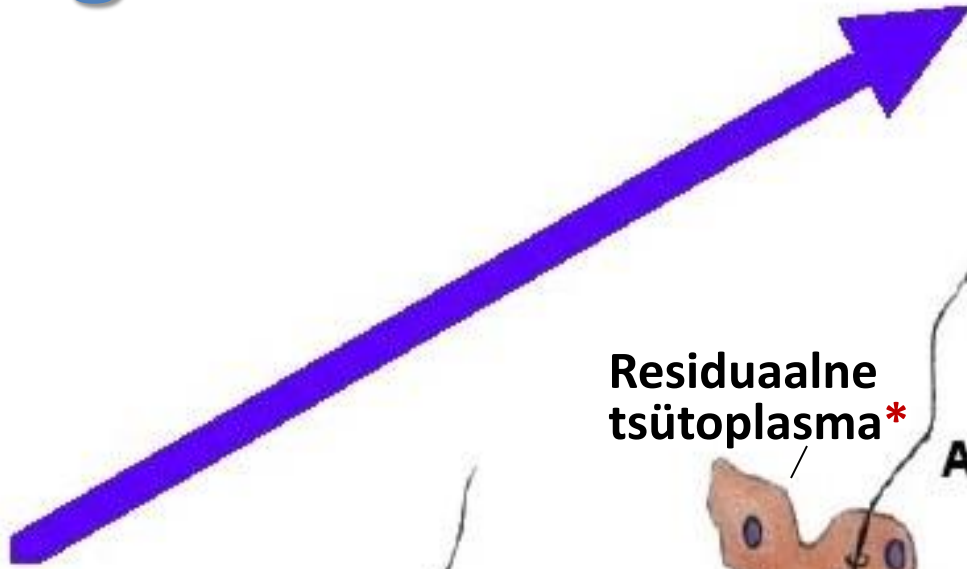
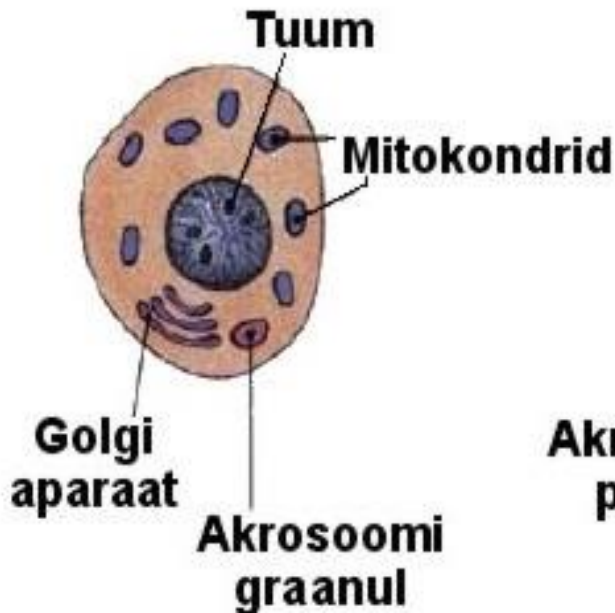


Sertoli rakkude paigutus



Spermiogeneees

SPERMATIID



Moodustuv akrosoom

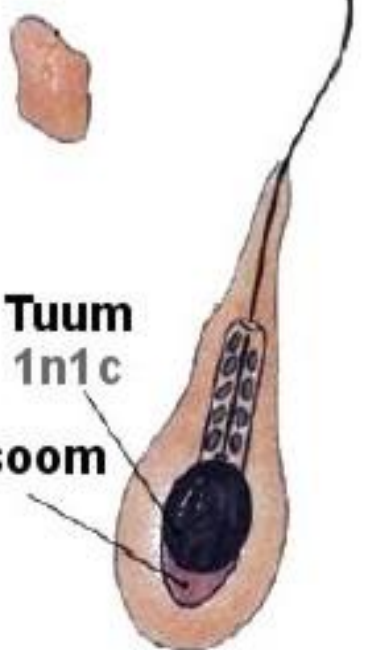
Residuaalne tsütoplasma*



Akrosoom

**Tuum
1n1c**

SPERM



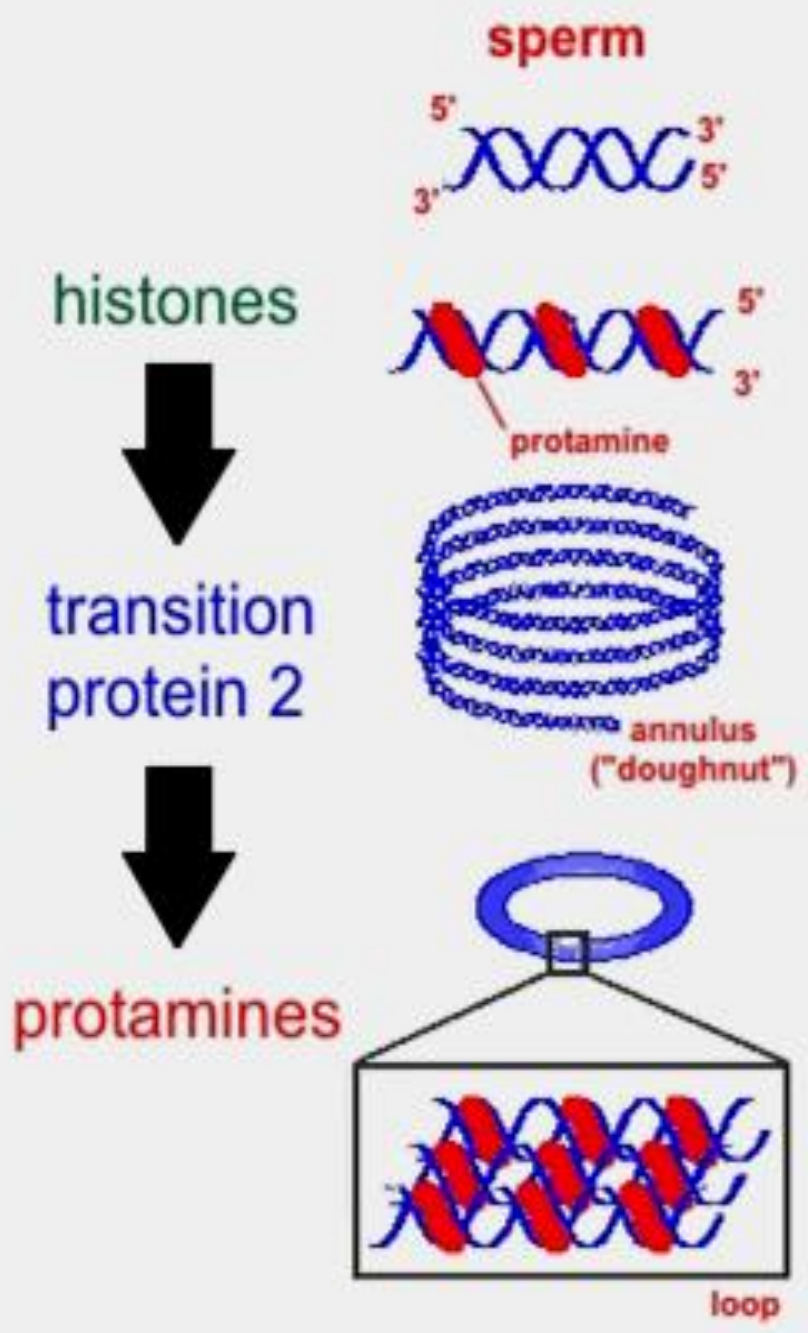
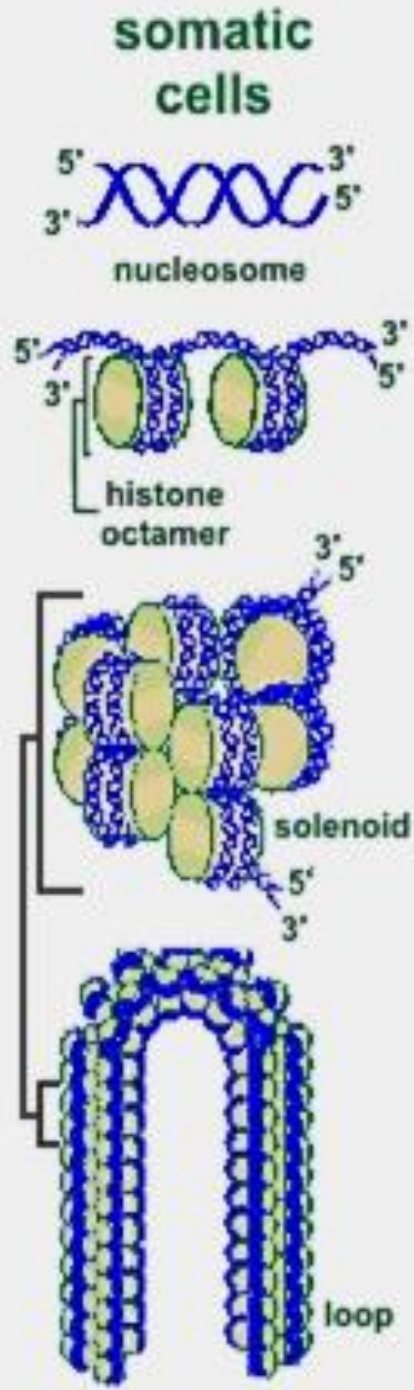
* üleliigse tsütoplasma eemaldamine

Spermi DNA pakkimine

Seemnerakkude kromosoomid on kokkupakitud 6 korda tihedamini kui mitootilised kromosoomid.

Histoonid asendatakse protamiinidega.

15% DNA-st jääb siiski histoonidega seotuks – neid geene on vaja viljastamisel ja varajases arengus!

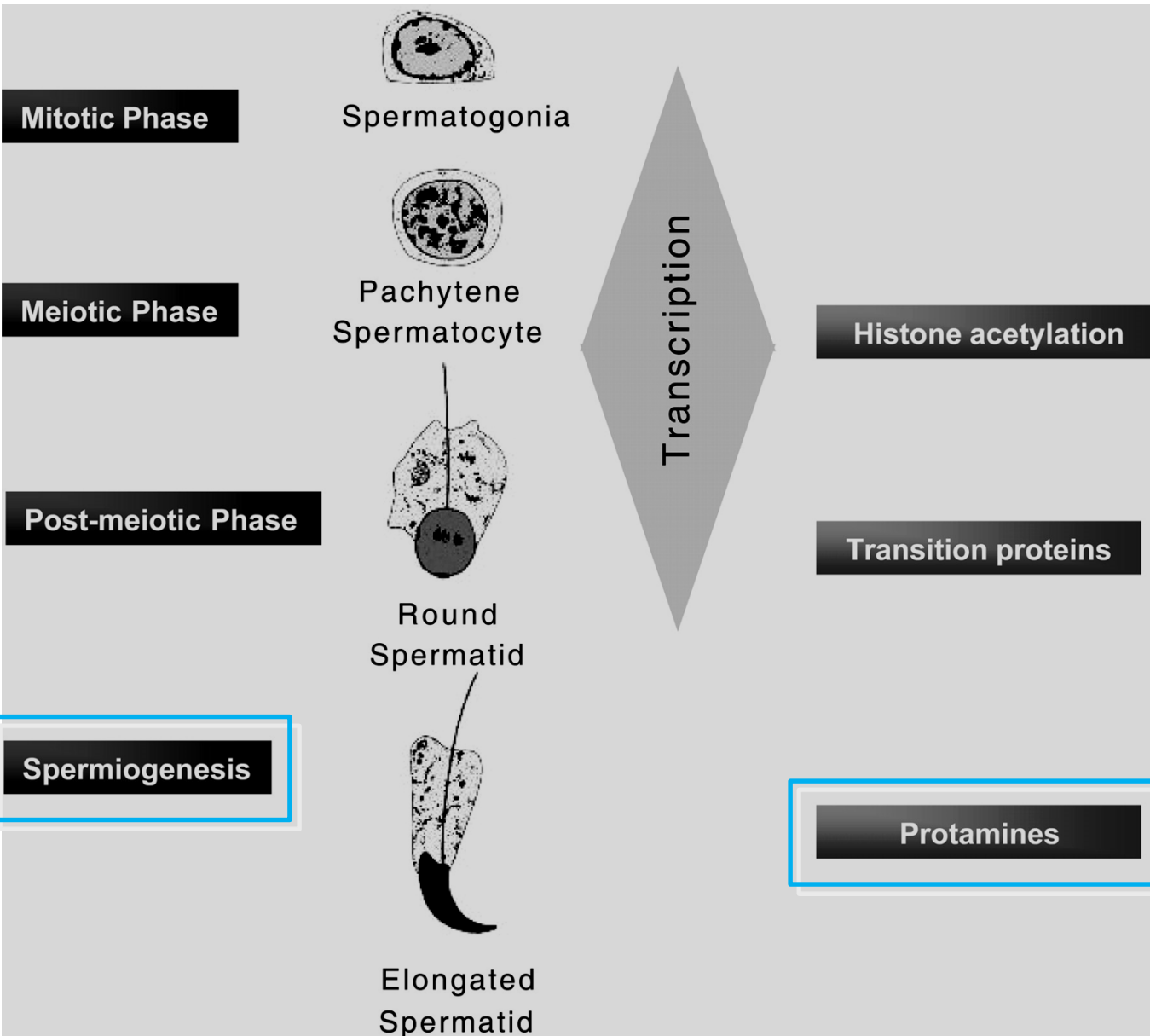


histones

transition protein 2

protamines

DNA transkriptsiooniline aktiivsus spermatogeneesi ajal

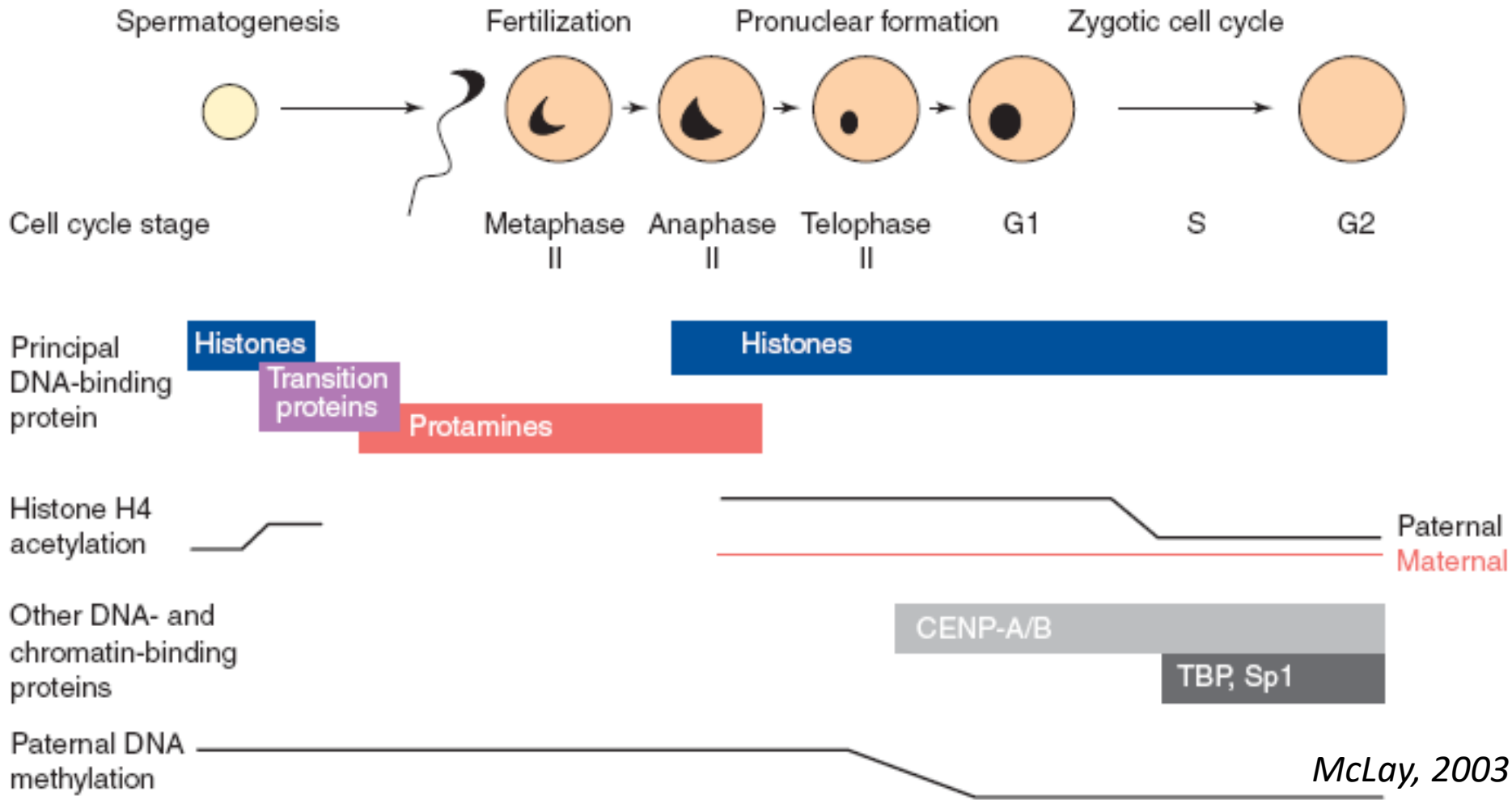


Geenide
ekspressioon ja
aktiivne
transkriptsioon

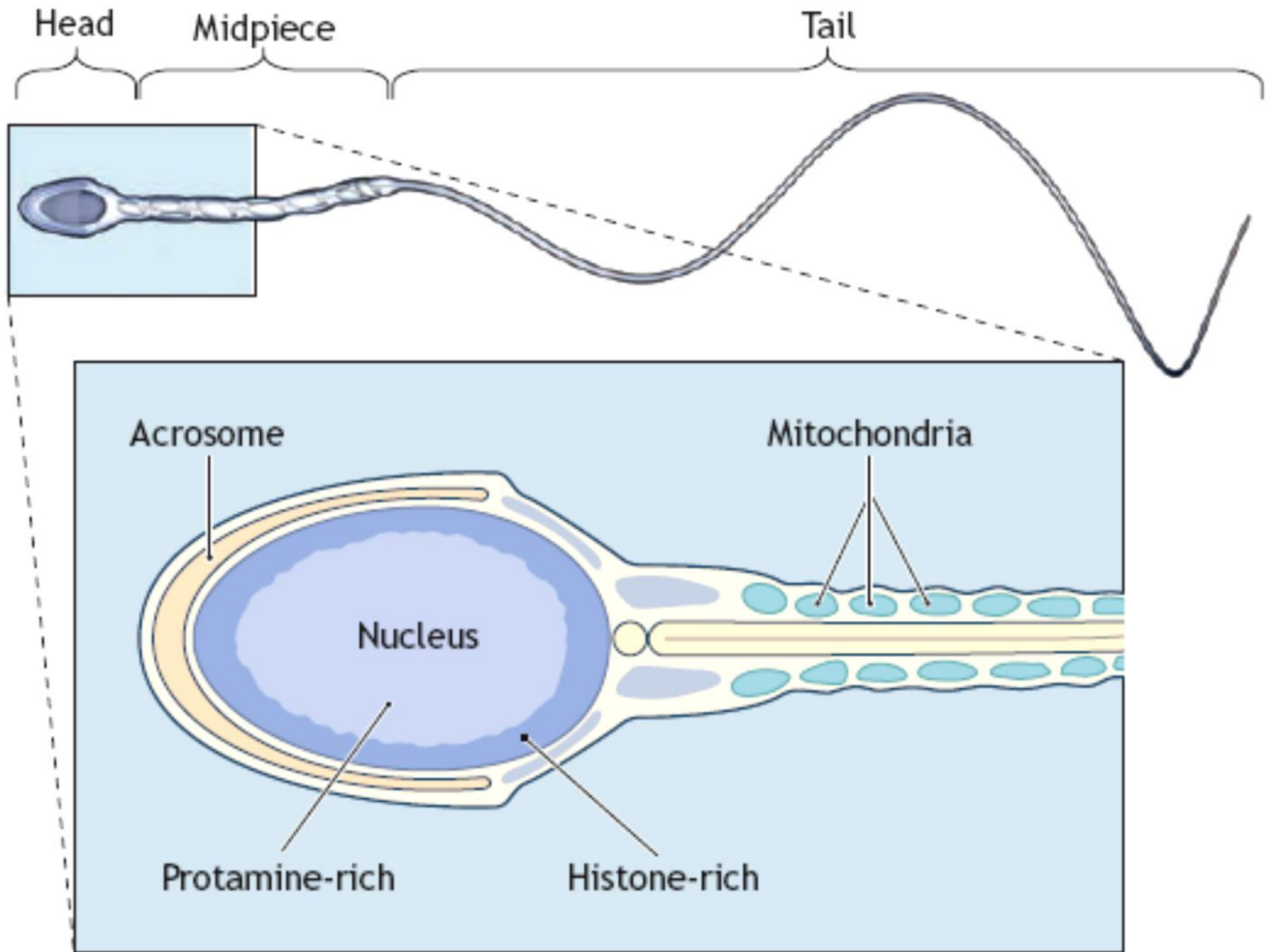
Maksimaalne
intensiivsus
I profaasis

Vajalik **meioosi**
kulgemiseks,
näit krossingoveri
läbiviimine, käävi
moodustumine jne
spermiogeneesi
toimumiseks,
näit histoonide
asendamine
protamiinidega jne

Sperm chromatin remodelling in mammals



Isaspronukleuses, mis kujuneb spermi tuumast, asendatakse protamiinid histoonidega. Protsessi õnnestumine sõltub omakorda ootsüüdi küpsusastmest.



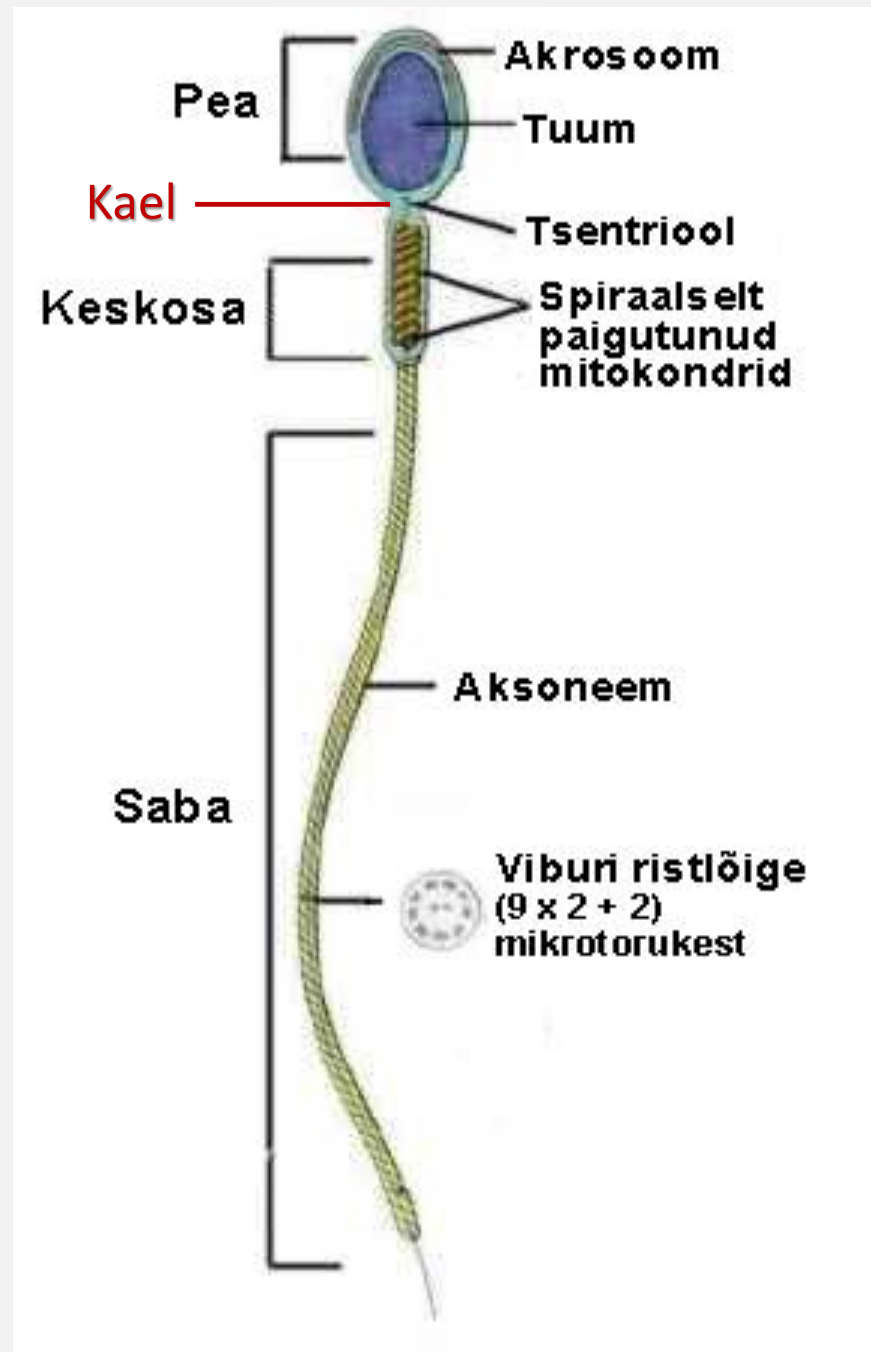
Spermi morfoloogia

Inimese spermi mõõdud:

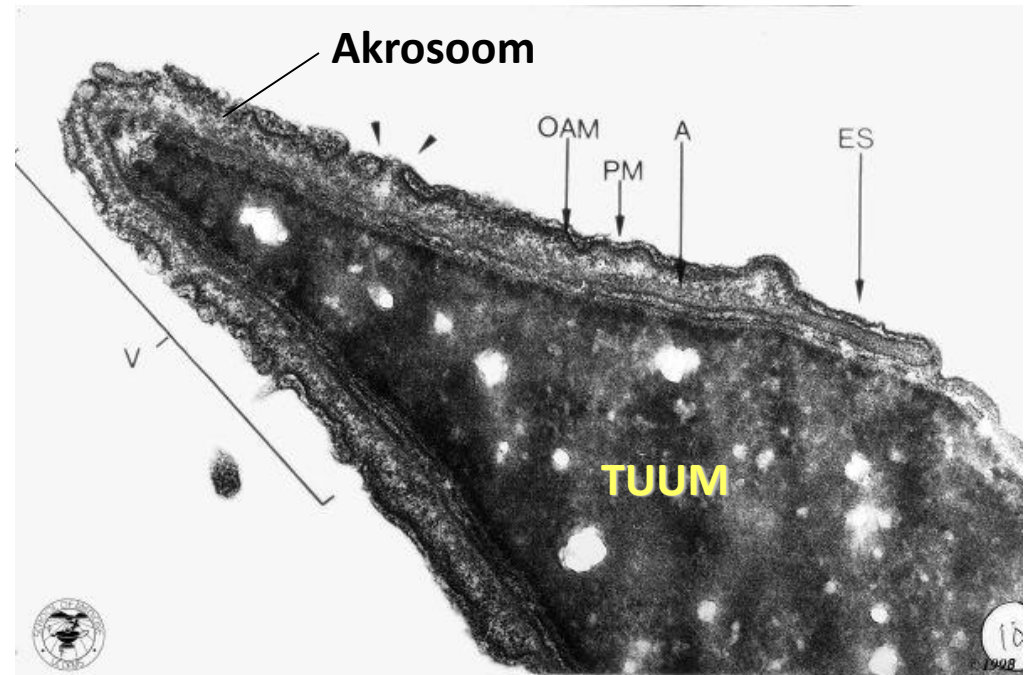
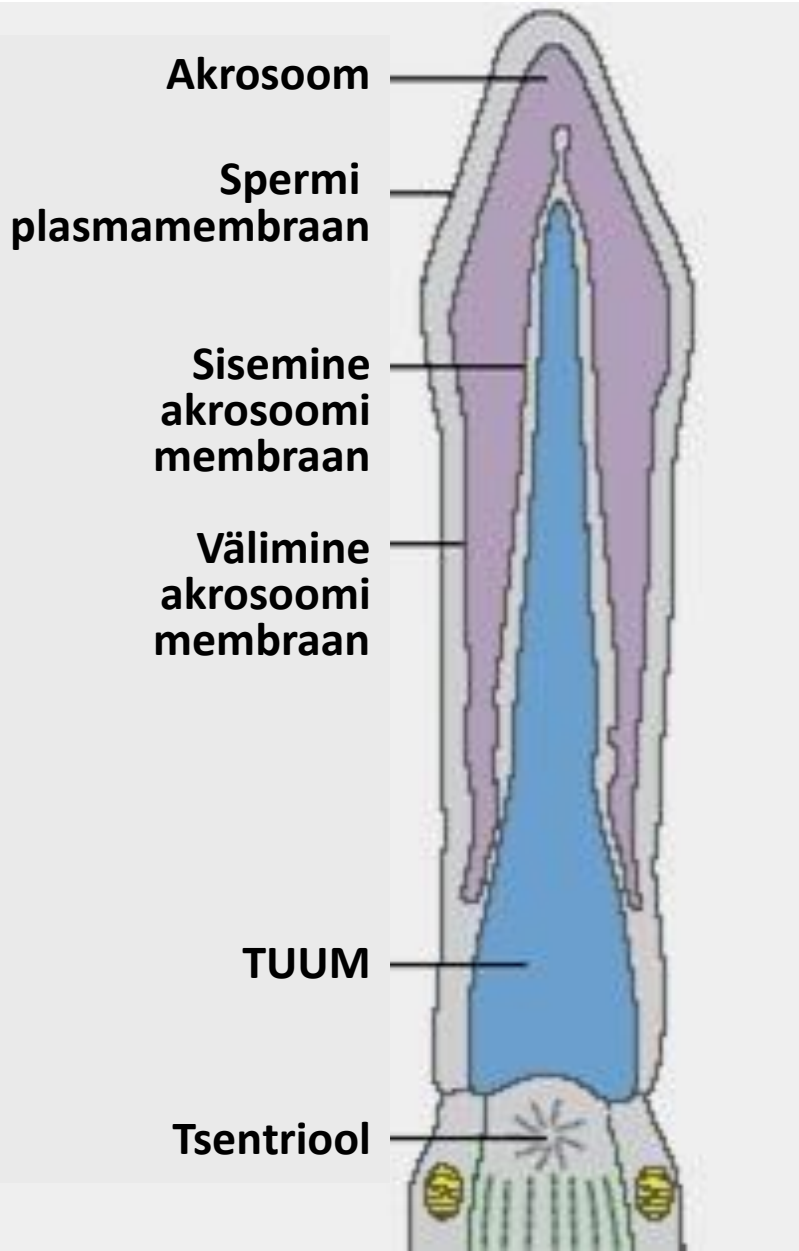
Pea 3-5 μm

Keskosa 7-8 μm

Saba 45-55 μm

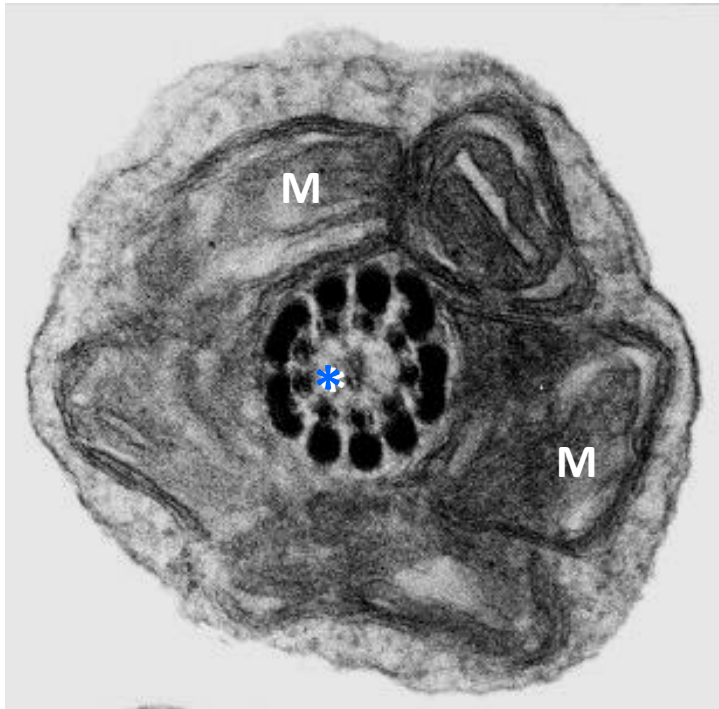


Spermi ultrastruktuur_1



ELEKTRONOGRAMM

Spermi ultrastruktuur_2



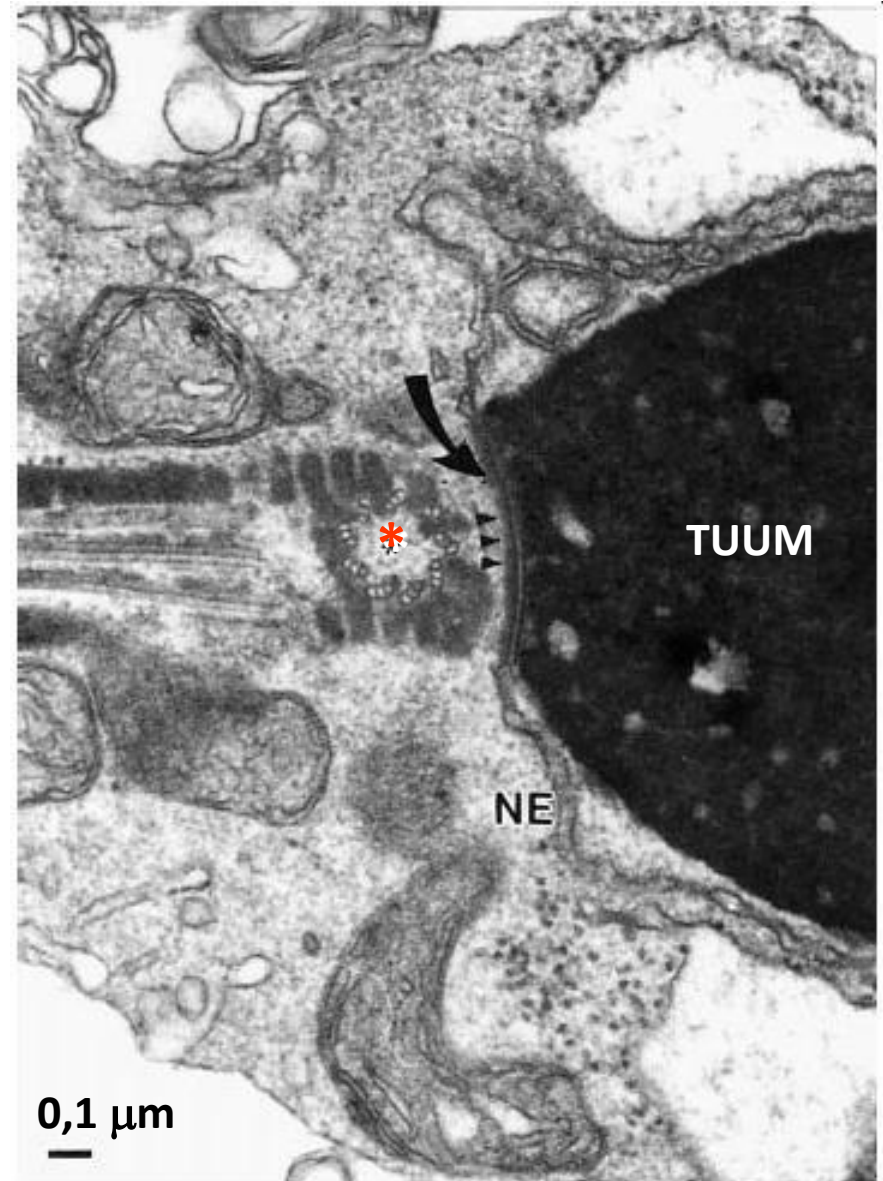
Üleval ristlõige spermi keskpiirkonnast,
paremal pikilõige

M - mitokonder (~10 mitokondrit)

* - vibur (9x2 +2 mikrotuubulit)

* - tsentriool (9x3 mikrotuubulit)

NE - tuumaümbris



Meeste viljatuse ehk infertiilsuse põhjuseid

- **15-30%** juhtudest seotud **geneetilise faktoriga**:
tsütogeneetilised kõrvalekalded (Y-kromosoomi mikrodeletsioonid, aneuploidiad - nt 47, XXY jt aberratsioonid), **geenmutatsioonid** (tsüstiline fibroos, mtDNA jt).
- hormonaalsed põhjused testosterooni ja gonadotropiinide sünteesi häired
- spermatoosoidide vähene hulk ja spermatoosoidide kvaliteet
azoospermia, oligozoospermia, morfoloogia vead, vähene liikuvusvõime
- haigused: infektsioon → põletik → leukotsüütide arvu tõus → **oksüdatiivne stress**.
Mittenakkuslikest haigustest on sagedaseim põhjus **varikotseele**. Esineb 38%-l infertiilsetest meestest. Elu jooksul areneb välja ~15%-l meestest.
Varikotseele on seemneväädi veenide ebanormaalne laienemine.
- anatomilised põhjused krüptorhism, genitaalide vigastused jt
- keskkonna kahjustav toime (toksiinid, suitsetamine -eriti ema suitsetamine)
- seleeni puudus (Se akumuleerub spermiogeneesi ajal spermi kaelaossa)
Se defitsiidi korral spermi kaelapiirkond murdub – ei ole viljastamisvõimeline.
Spermatogeneesi ajal **selenoproteiin** (fosfolipiid, glutatiooni peroksüdaas) muudab **peroksiide alkoholideks - kaitse oksüdatiivse stressi eest!**

Sperma kvaliteet

Spermatoosoidide kvaliteet

Ejakulaadi uuring / norm väärtused

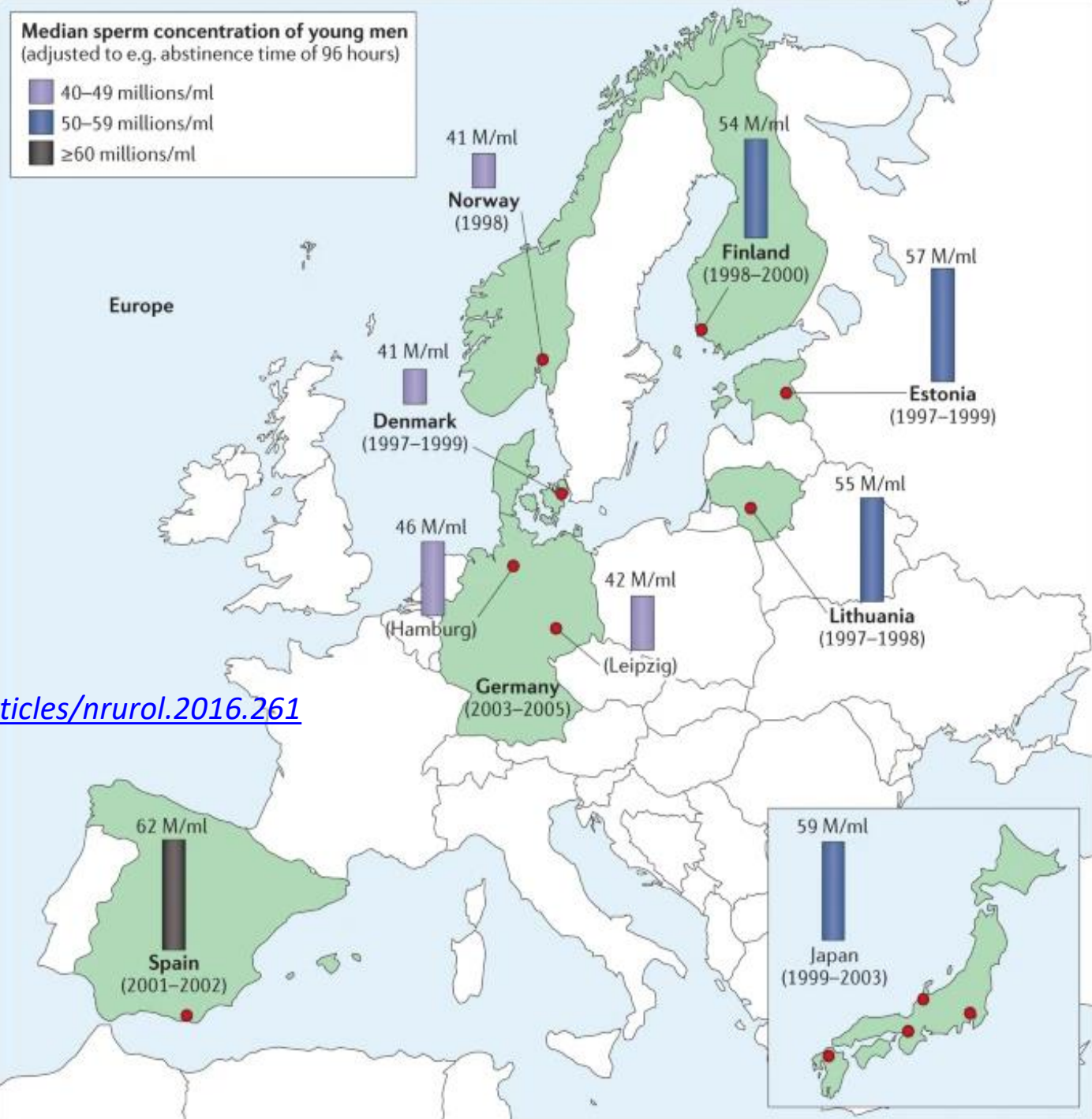
WHO referentsväärtused 2010 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934213>

- **sperma maht** > 2 ml
- **spermatoosoidide kontsentratsioon** 20- 40 mln/ml; viljatus < 20 mln/ ml
- **liikuvus**, sperme liikuvusega $\geq 25 \mu\text{m/s}$ on $\geq 25\%$
- **spermatoosoidide morfoloogia**
- **leukotsüütide kontsentratsioon** (põletiku näitaja) neutrofiilide arv < 1 mln/ml
- **autoimmuunreaktsioon** / puudub dr M. Punab < 0,2 mln/ml

Spermatoosoidide kvaliteedi uuring:

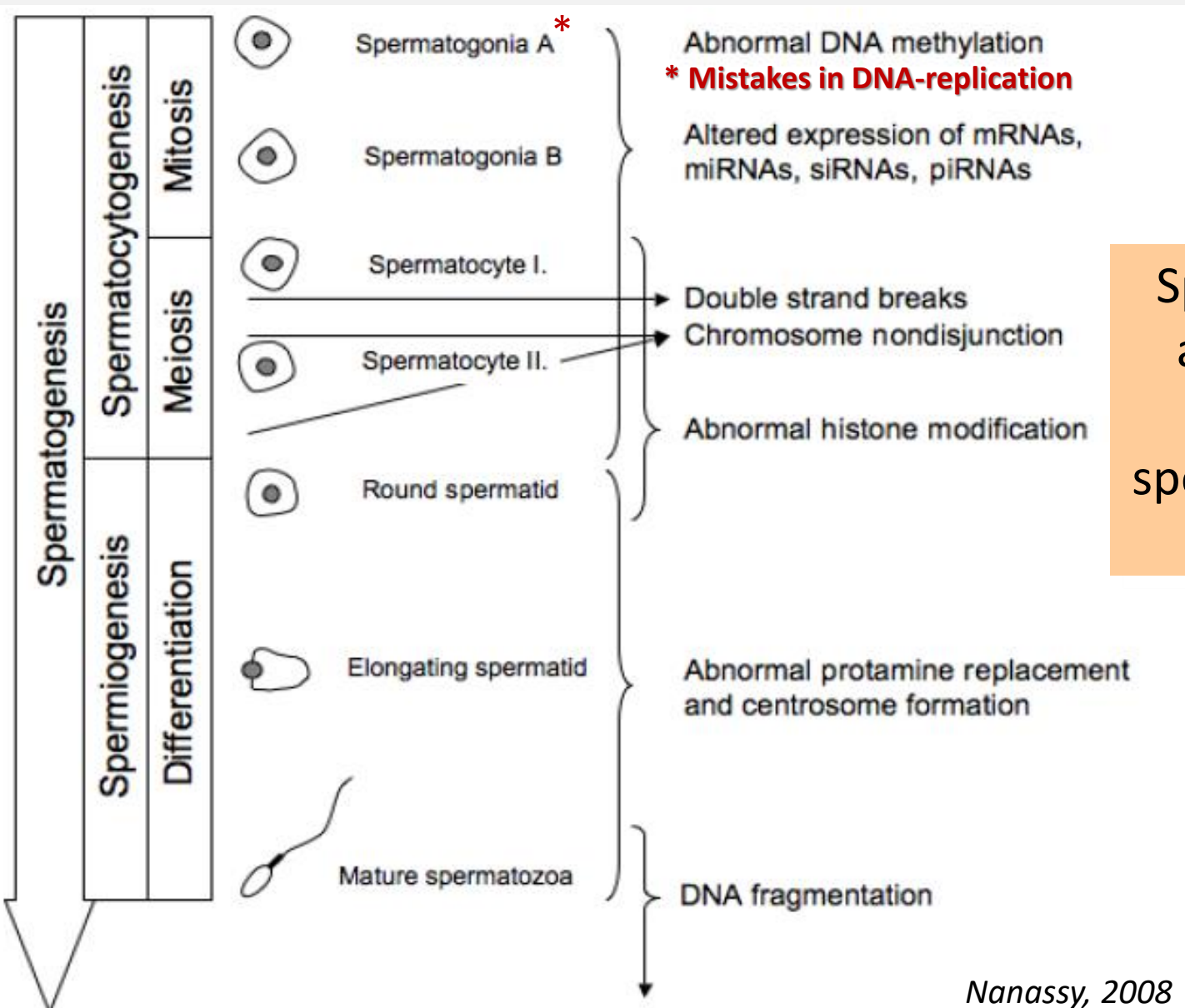
1. **morfoloogia** (akrosoom, pea, keskosa, saba)
2. **liikumisevõime** (seos: halb liikumisevõime on seotud spermi DNA kvaliteediga)
3. **kromosoomide arv** (aneuploidia, polüploidia)
4. **kromosoomide morfoloogia** (aberratsioonid)
5. **DNA kvaliteet** <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-014-0194-3>
(kokkupakkimisaste, fragmenteerumine, histoonide-protamiinide suhe)

Semen quality in the 21st century



Virtanen HE et al.
Nature Reviews Urology
<https://www.nature.com/articles/nruol.2016.261>

The origin of genetic and epigenetic abnormalities during spermatogenesis



Spermatogeneesi ajal hävib ~75% arenevatest spermatotsüütidest

Holstein, 2003

Spermi DNA kahjustumise põhjusi

- ravimid, kemoteraapia, kiiritusravi
 - suguteede põletikud – oksüdatiivne stress*
 - testikulaarne hüpertermia
 - varikotseele
 - hormonaalsed faktorid
 - suitsetamine jt väliskkk **toksiinid**
 - **vanusega** väheneb raku võimekus leida ja parandada DNA sünteesil tekkinud vigu
- NB! **Spermatogoonid on mitootiliselt aktiivsed rakud.**

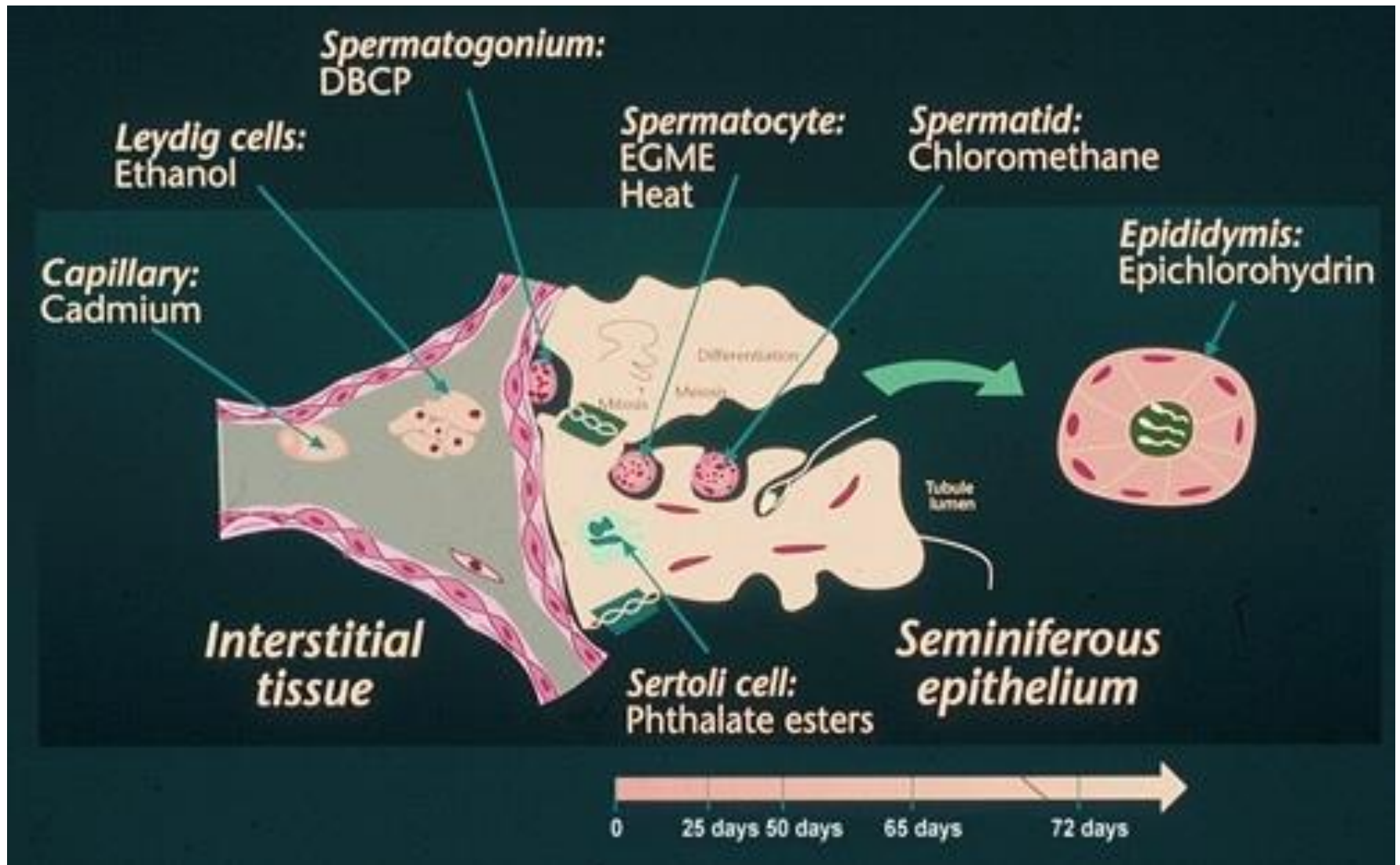
Spermi DNA kvaliteedi hindamise meetodeid

Test	Measures	Characteristics
Sperm chromatin structure assay	Susceptibility of sperm DNA to denaturation	Objective, flow cytometry-based, indirect assay, complex analysis, used clinically
Nuclear protein composition (by protein separation)	Sperm histone and protamine levels	Objective, gel electrophoresis assay, indirect assay, labour intensive
Sperm nuclear maturity test (by nuclear staining)	Chromatin compaction, protamine content	Simple, semi-quantitative, slide-based, indirect assay
Comet assay (by single-cell gel electrophoresis)	Double-stranded DNA breaks (neutral assay)	Objective, quantitative, direct assay, complex image analysis
TUNEL assay	Double-stranded DNA breaks	Semi-quantitative, direct assay, quantitative if flow cytometry-based

* 2017 Dorostghoal M et al. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28124476>

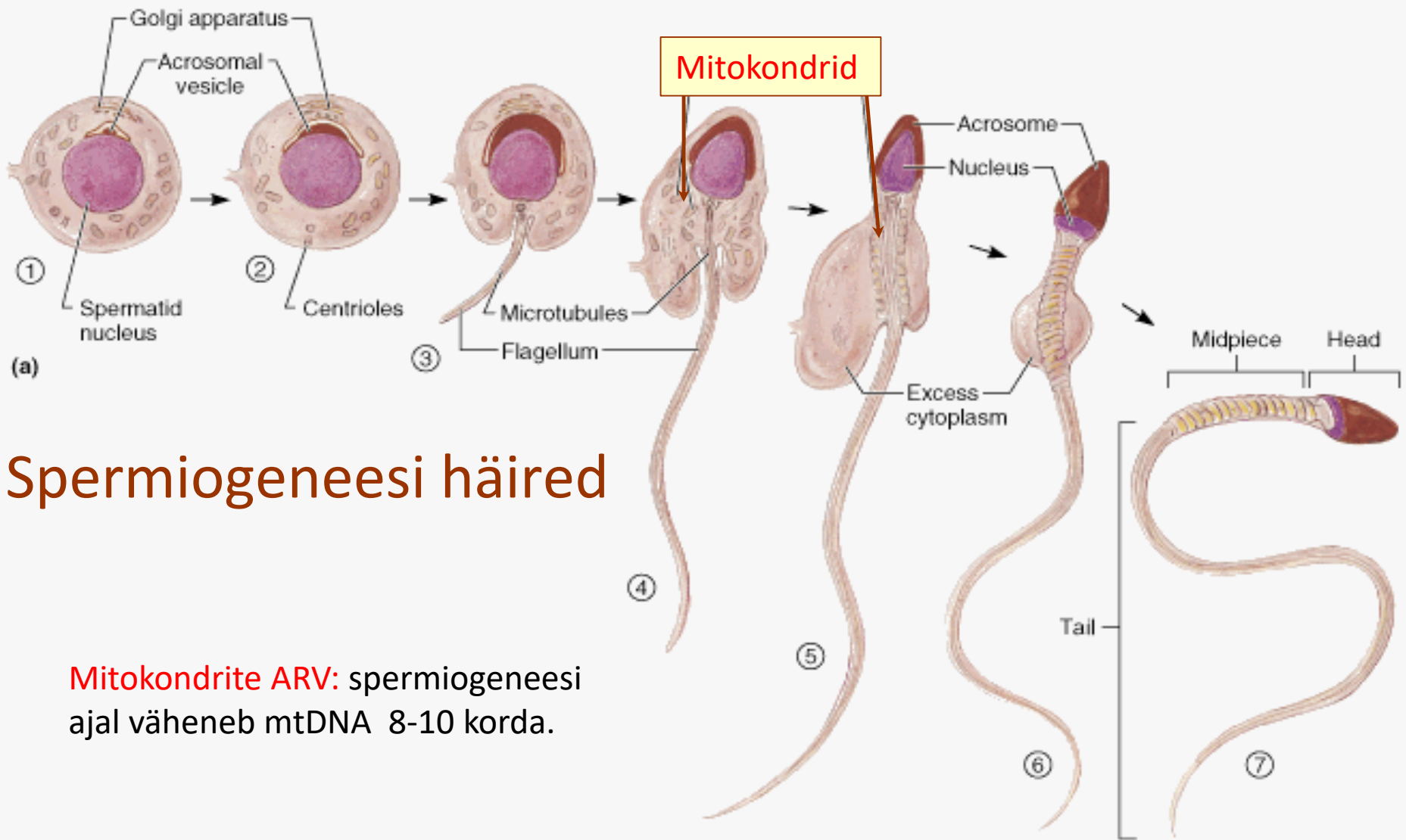
2022 Gallo A. *Reprotoxic Impact* of Environment, Diet, and Behavior.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8834893/pdf/ijerph-19-01303.pdf>



Male reproductive organs are at risk from environmental hazards.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966832>

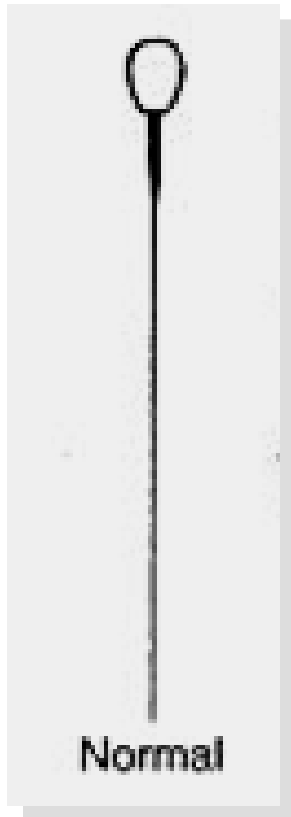


Spermiogeneesi häired

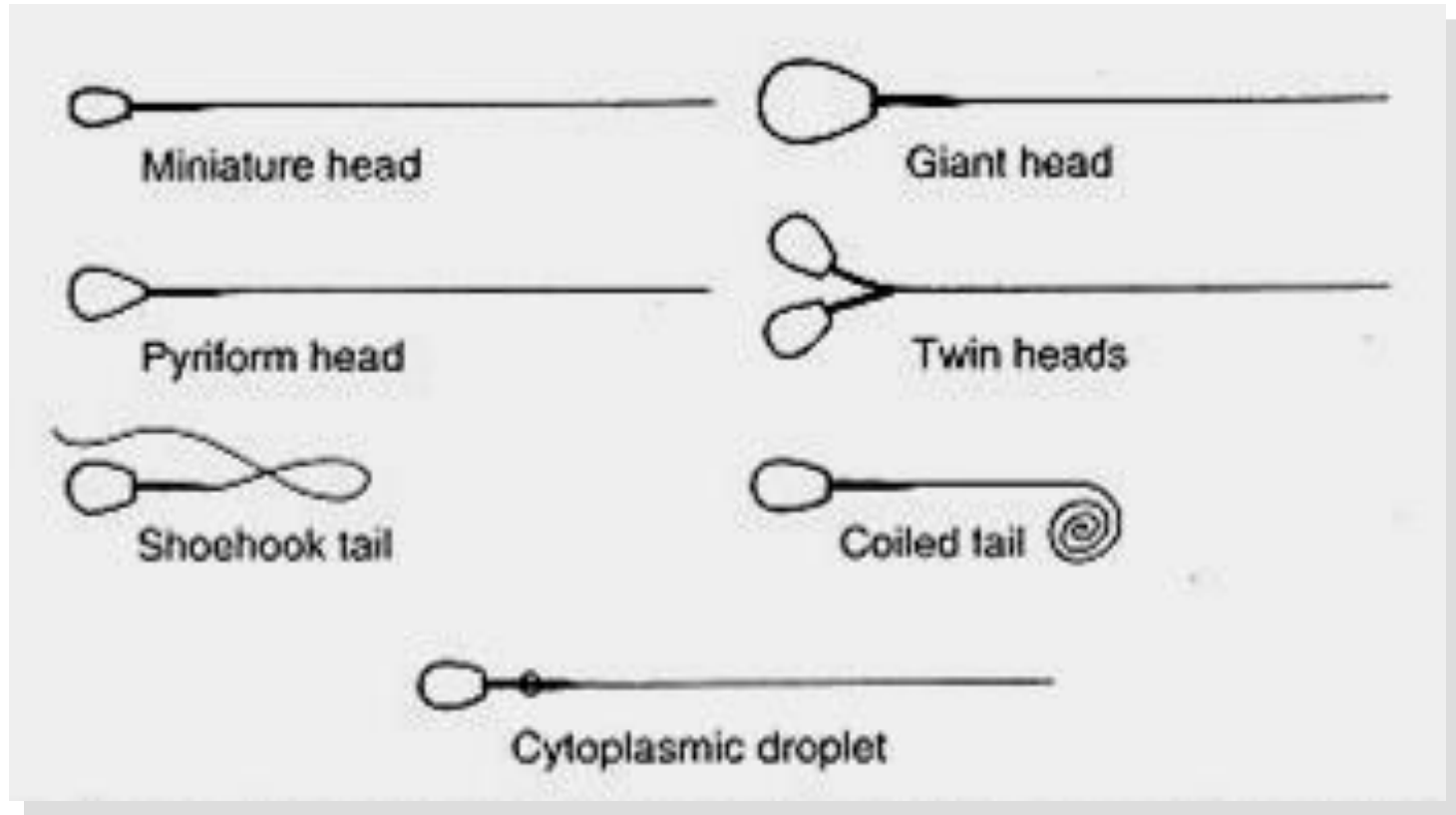
Mitokondrite ARV: spermiogeneesi ajal väheneb mtDNA 8-10 korda.

Increased mtDNA copy number in poor quality sperm may result from excessive levels of oxidative stress and **a retarded elimination** process during spermatogenesis.

Normaalne sperm



Valik ehituse kõrvalekaldeid



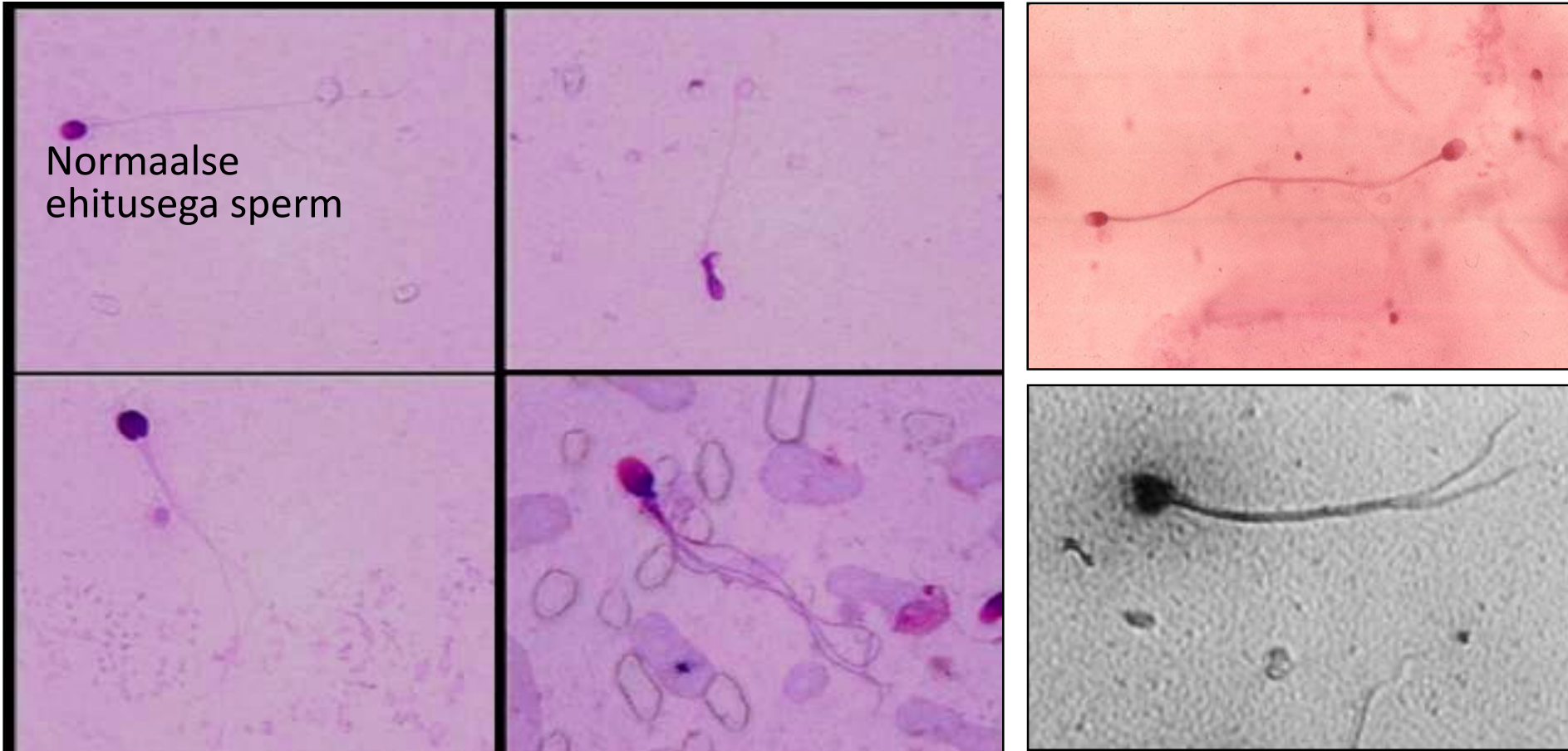
Fertilisetal meestel $\geq 12\%$ normaalse morfoloogiaga sperme/ WHO $> 15\%$
9-12% nn subfertiilsed mehed

Ehituselt normaalsete spermide % on üks peamisi
meeste viljakusega üheselt seotud parameeter.

Inimese ebanormaalse morfoloogiaga sperme

* *teratozoospermia* - ebanormaalse ehitusega spermid

Normaalse ehitusega sperm



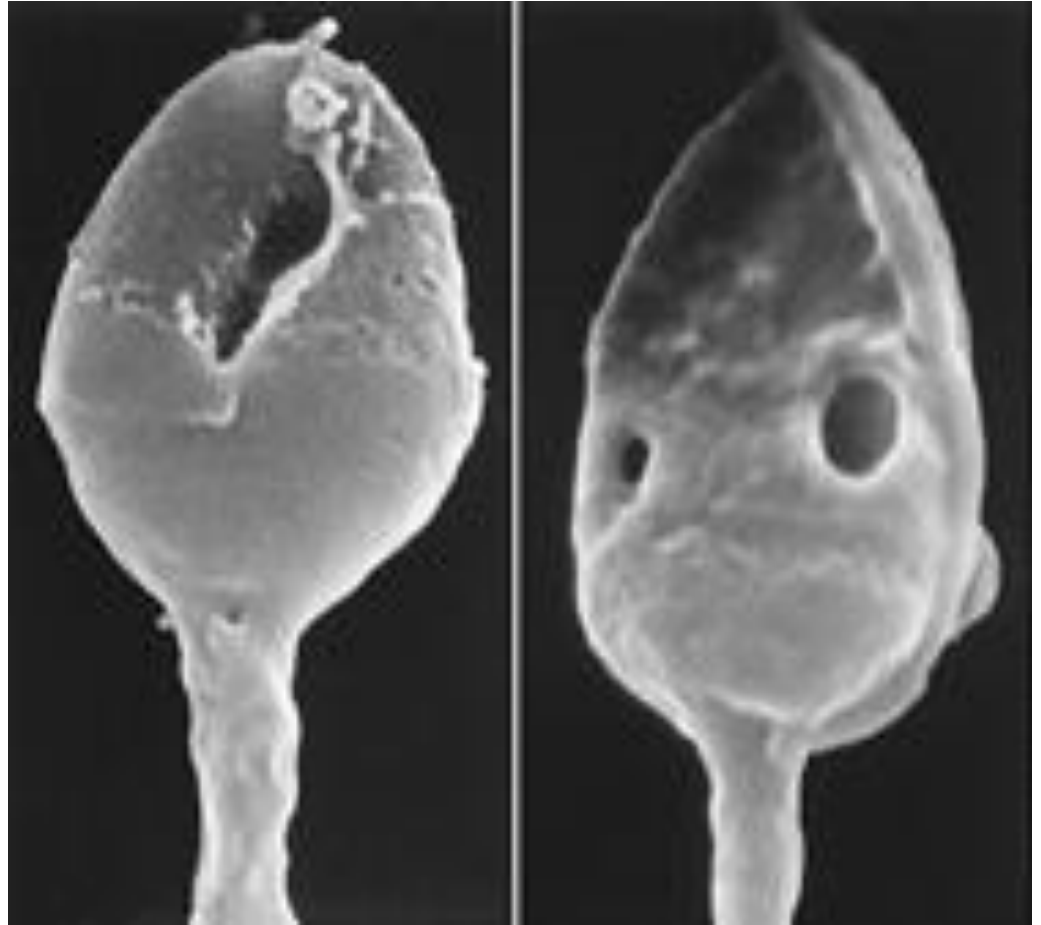
2006 Sun et al. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1395314/>

Spermide päid

Normaalne



Ebanormaalsed



2018 Oumaima A etal. Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29508198>

EESTIS TEGELEVAD MEHEPOOLSE VILJATUSE UURINGUTEGA

MEESTEKLIINIK TARTUS

Tartu, L.Puusepa 1a

UURINGUTE ja RAVIGA

MEESTEKLIINIK TALLINNAS

Tallinn, Gonsiori 3

prof Maris Laan	Meeste viljatuse mono- ja digeensed põhjused. TÜ MV, TÜ Kliinikum
Kristel Ehala-Aleksejev 2019 doktoritöö	Rasvumise ja metaboolse sündroomi mõju mehe viljakusele. Juhendaja dr M Punab
dr Kristo Ausmees 2014 doktoritöö	Keskealiste meeste reproduktiivfunktsioon: seos eesnäärme, elustiili faktorite ja paari viljatusega. Juhendajad dr R Mändar, M Punab
dr Jelena Lissitsina 2011 doktoritöö	Meeste viljatuse tsütogeneetilised põhjused. Juhendaja dr R Mikelsaar
dr Margus Punab 2007 doktoritöö	TÜ Kliinikumi Meestekliiniku juht, androloogia professor Meeste viljakus ja selle riskitegurid Eestis. Juhendaja dr A Peetsalu
dr Paul Korrovits 2008 doktoritöö	<i>Asymptomatic inflammatory prostatitis: prevalence, etiological factors, diagnostic tools.</i> Juhendajad dr R Mändar, M Punab
Gerly Kilusk 2005 magistritöö	<i>Oxidative stress, male factor infertility and the possible impact of nutrition habits.</i> Juhendaja dr A Salumets

Viljatusuuringud TÜ-s

Teadusprojekt: Meeste viljatuse mono- ja digeensed põhjused: uued leiud eksoomi sekveneerimise ajastul, nende pleiotroopsed mõjud ja kliiniline kasu.

Periood: 01.01.2021–31.12.2025

Vastutav täitja: Maris **Laan**, inimese geneetika professor, akadeemik

TÜ MV BSMI

<https://tervis.postimees.ee/7167339/eesti-meditiiniteadlased-otsivad-meeste-viljatuse-uusi-parilikke-pohjuseid>

2006 Jelena Lissitsina *Cytogenetic causes of male infertility*

http://dspace.utlib.ee/dspace/bitstream/handle/10062/16469/lissitsina_jelena.pdf?sequence=1

Viljatutel meestel on kromosoomaberratsioone ~ 30%

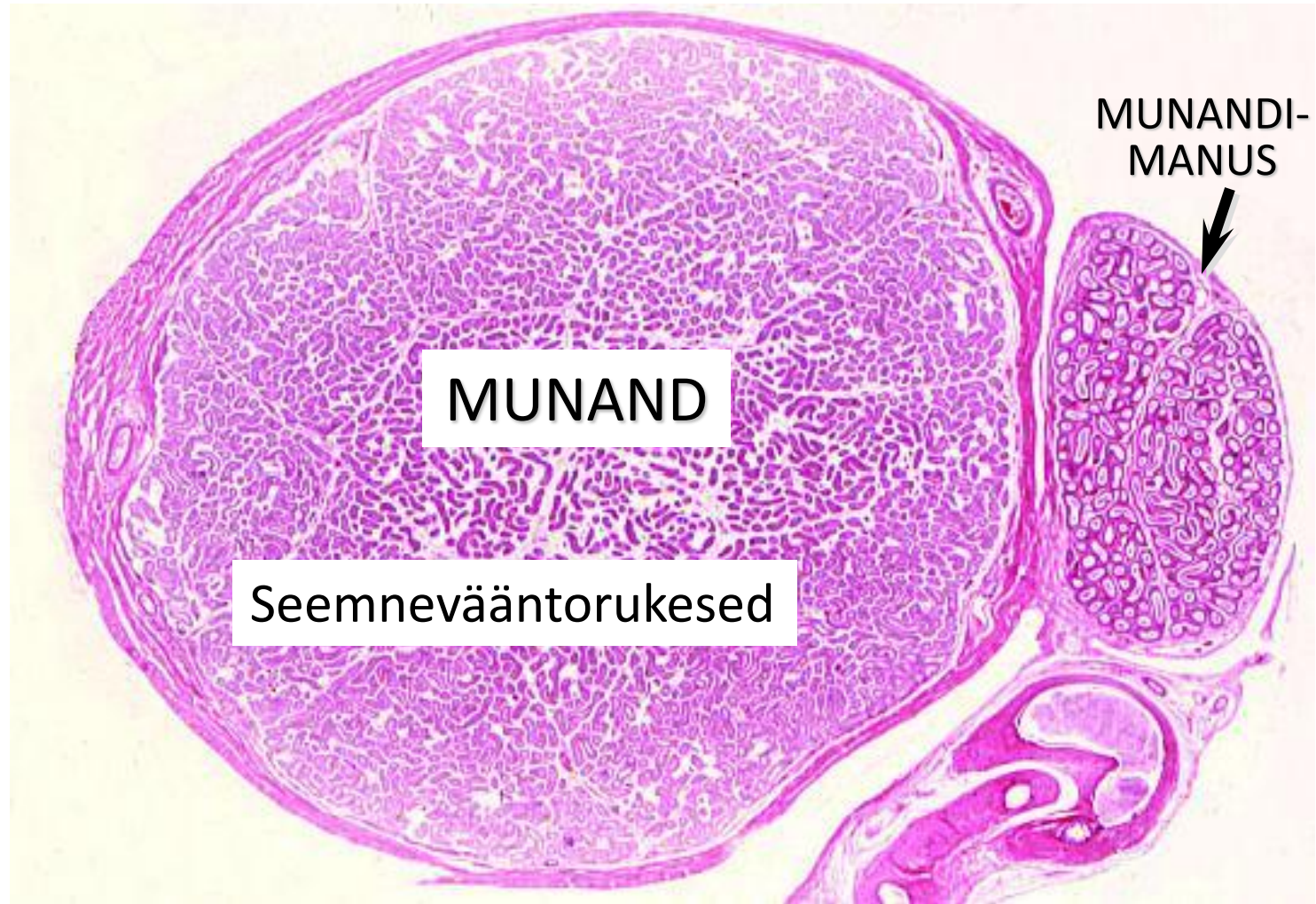
Eesti: Viljatutel meestel on kromosoomaberratsioone ~47%

2011 Michael C Hann, Patricio E Lau, Helen G Tempest

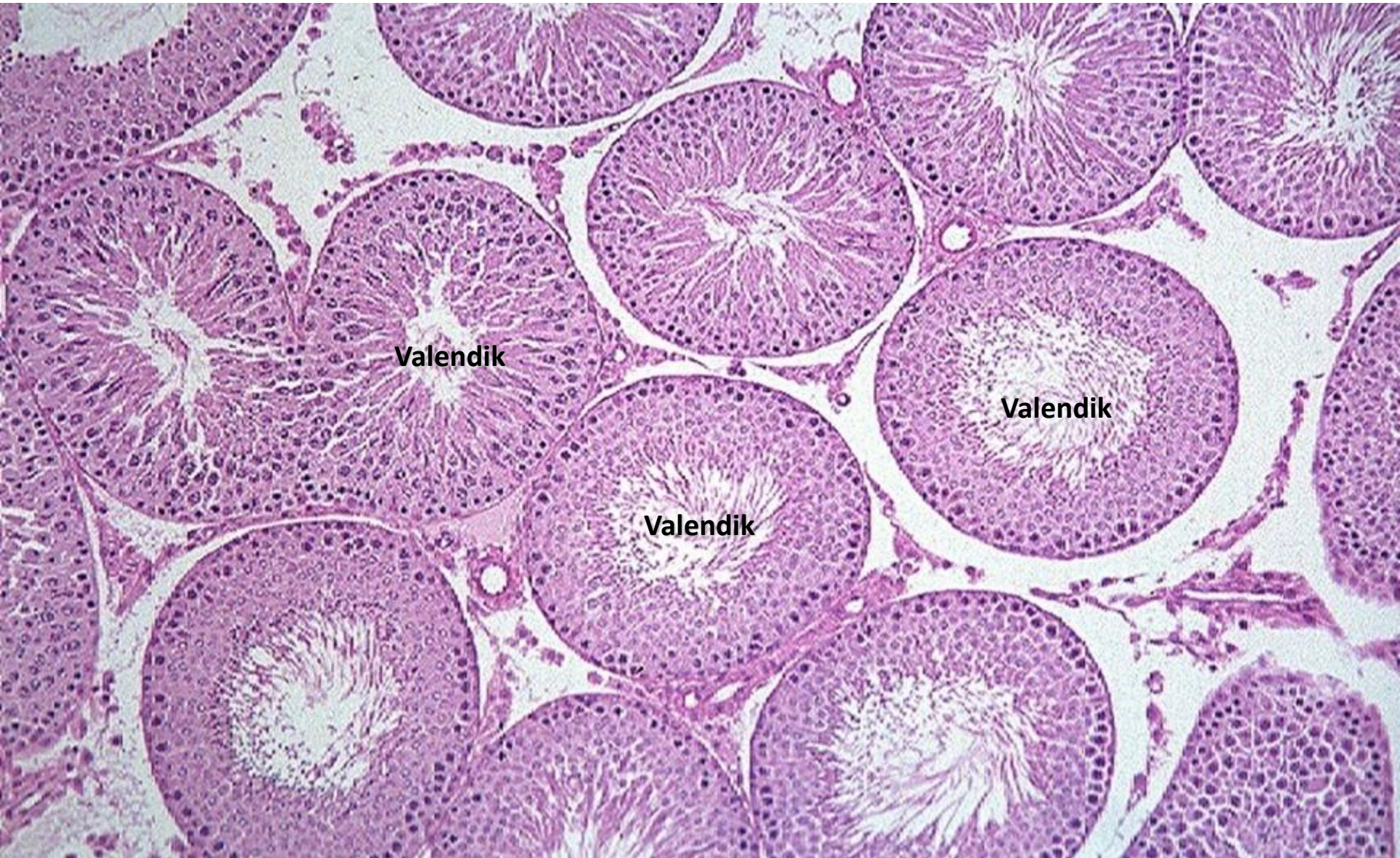
Meiotic recombination & male infertility: from basic science to clinical reality?

<http://www.nature.com/aja/journal/v13/n2/full/aja20111a.html>

Inimese munand ehk testis ja munandimanus ehk epididüüm

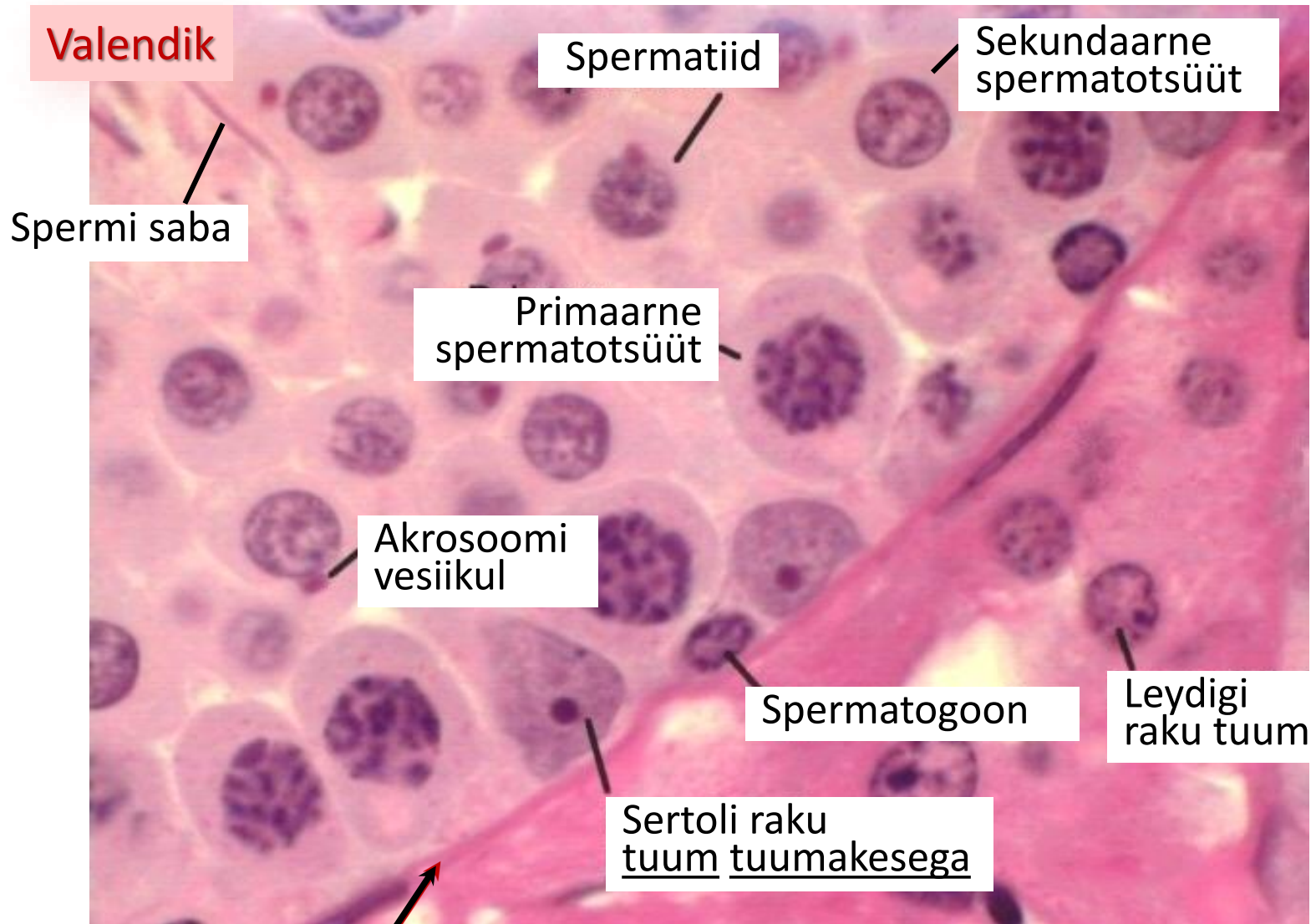


Hiire testis ristlõikes. Seemnevääntorukesed.Preparaat



Sektor hiire seemnevääntorukesest.

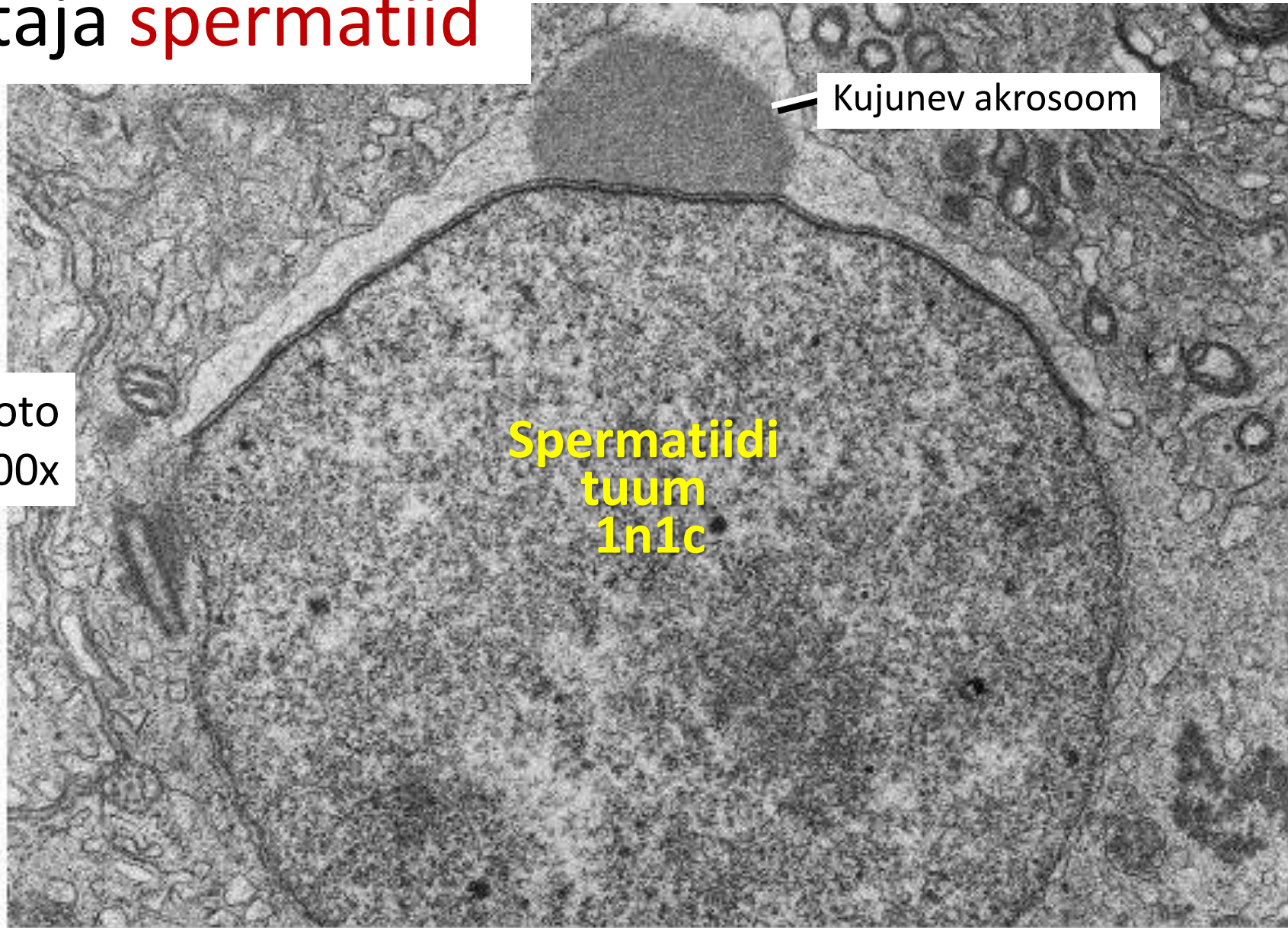
Püsipreparaat



Basaalmembraan

Suurendus: 1500 x

Imetaja spermatiid



2012 Sathananthan AH. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22687884/>

Inimese spermid

