

## Podłoża do rozwoju zarodków w technikach wspomaganego rozrodu

Potoczna nazwa technik wspomaganego rozrodu – „in vitro” pochodzi od łacińskiego określenia „w szkle” i oznacza procesy biologiczne przeprowadzane w warunkach laboratoryjnych, poza organizmem. W przypadku technik wspomaganego rozrodu, określenie „w szkle” doskonale opisuje sposób w jaki postępuje się z ludzkimi komórkami rozrodczymi i zarodkami.

Wszystkie procedury wspomaganego rozrodu służą zwiększeniu szansy uzyskania ciąży, ale by to umożliwić konieczna jest praca z materiałem biologicznym, czyli żywymi komórkami. Zarówno w przypadku inseminacji domacicznej (IUI), jak i technik „in vitro” (np. ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika) kluczową rolę odgrywają żywe komórki, które w warunkach laboratoryjnych muszą funkcjonować i rozwijać się, by możliwe było uzyskanie ciąży. Jednak żadna komórka nie może funkcjonować bez odpowiedniego wsparcia, które musi być jej zapewnione w laboratorium.

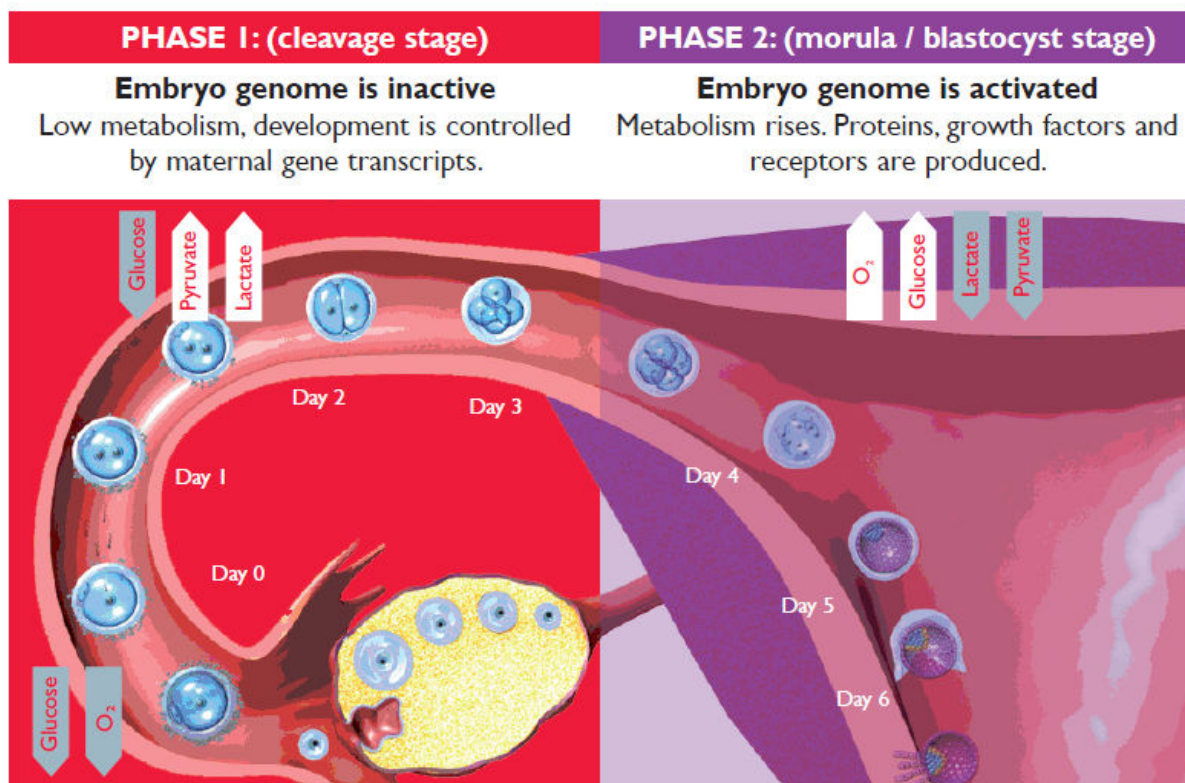


Komórkami rządzą te same, dobrze wszystkim znane prawdy, które dotyczą samego człowieka. Nasze ciało średnio w 60% procentach składa się z wody, a człowiek bez dostępu do wody może przeżyć najwyżej kilka dni. Bez pokarmu człowiek jest w stanie przeżyć znacznie dłużej, ale tylko dzięki nagromadzonym w tkance tłuszczowej substancjom energetycznym. Do życia potrzebujemy powietrza, a ściślej tlenu, który umożliwia zachodzenie procesów spalania w naszym organizmie. Do naszego rozwoju potrzebujemy witamin, diety bogatej w wiele składników odżywczych i substancji chemicznych. By hamować procesy starzenia niezbędne są nam przeciwutleniacze (antyoksydanty), tak często stosowane dzisiaj w kosmetykach czy produktach spożywczych. Wszystkie te substancje są nam niezbędne do życia i rozwoju. Tych samych substancji wymagają komórki rozwijające się w laboratorium.

Aby dostarczyć wszystkie te substancje do komórek, w warunkach laboratoryjnych stosuje się tzw. media czyli podłoża. Są to specjalnie przygotowane roztwory, zawierające wszystkie niezbędne komórkom substancje i zapewniające im optymalne warunki do życia.

Ich skład jest bardzo różnorodny, w zależności od ich przeznaczenia oraz typu komórek a ilość zawartych w nich substancji i związków chemicznych może być ogromna.

Od czasu gdy lekarze i naukowcy rozpoczęli prace nad opracowaniem technik wspomaganego zapłodnienia, stanęli przed problemem zapewnienia plemnikom, komórkom jajowym i zarodkom optymalnych warunków. Przez lata trwały liczne badania, które miały na celu ustalenie niezbędnych do życia tych komórek związków i ich stężenia. W tym celu min. badano substancje, występujące w ich naturalnym środowisku – np. w ludzkim nasieniu, czy wydzielinie produkowanej w jajowodzie. Podglądając naturę oraz obserwując wpływ różnych substancji na żywe komórki zdefiniowano szereg związków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania i rozwoju.



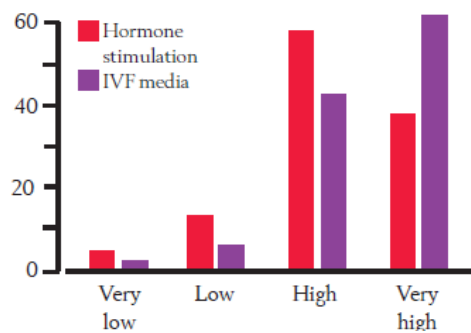
rys.1. Schemat zmian w metabolizmie zarodków w trakcie wędrówki przez drogi rodne Kobiety. (Źródło: ORIGIO product information)

Podstawowym składnikiem mediów jest woda o bardzo wysokiej czystości, w niej rozpuszczane są wszystkie pozostałe składniki, niezbędne do życia poszczególnych komórek. Glukoza i pirogronian sodu są związkami, które dostarczają komórkom energii.

Aminokwasy, to podstawowe składniki budulcowe dla białek, a witaminy z kolei pełnią kluczową rolę w wielu procesach metabolicznych. W wielu odczynnikach stosowanych w procedurach *in vitro* stosuje się dodatek białek ludzkiej albuminy (HSA). Jest to białko występujące w osoczu krwi, i stanowiące nawet 60% wszystkich zawartych w nim białek. Uważa się, że Albumina pełni kluczową rolę w wielu procesach biochemicznych, rozwoju zarodka i usuwaniu szkodliwych związków ze środowiska. Niezbędnym dodatkiem do mediów są również związki buforujące, głównie anion węglanowy, występujący naturalnie w organizmie ludzkim. Utrzymuje on pH środowiska na naturalnym poziomie.

W przypadku technik *in vitro*, skład poszczególnych mediów różni się w zależności od ich zastosowania. Inny skład mają podłoża stosowane podczas preparatyki nasienia (zarówno przed inseminacją, jak i przed ICSI), czy roztwory służące do pobierania oocytów. Szczególnie ważne są zmiany w składzie mediów podczas rozwoju zarodków. Przeprowadzone badania wykazały, iż na całej długości jajowodu kobiety zmienia się koncentracja wielu substancji, z czego wynika, iż zapotrzebowanie zarodka na substancje odżywcze zmienia się w trakcie jego rozwoju i wędrówki przez drogi rodne kobiety (rys. 1). Z tego względu w technikach *in vitro* stosuje się obecnie tzw. media dwustopniowe. Jedne medium posiada substancje optymalnie dobrane dla rozwoju zarodka do stadium ok. 8-blastomerów (dzień 3) a drugie zostało zoptymalizowane dla rozwoju zarodka do stadium blastocysty (dzień 5).

Szczególnie ważnym aspektem podłoż do technik *in vitro* jest ich jakość. Media mają bezpośredni kontakt z zarodkiem i to od ich składu zależy jego właściwy rozwój. W przeprowadzonej ankiecie pośród specjalistów IVF, ponad 55% uważa że media mają bardzo duży wpływ na wynik procedury *in vitro* (rys.2.). Z tego względu kładzie się bardzo duży nacisk na sposób ich przygotowania i pochodzenie poszczególnych składników. Począwszy od farmaceutycznej czystości wody i wszystkich komponentów, poprzez zachowanie sterylności, po wielokrotne badania jakości - na całym procesie produkcji dba się o wysoką jakość gotowego produktu. Szczególne znaczenie w tym procesie mają testy jakości, które mają na celu min. sprawdzenie czy w gotowym



Rys.2 W przeprowadzonej ankiecie pośród 1200 specjalistów IVF, ponad 55% uważa że media mają bardzo duży wpływ na wynik procedury *in vitro*, w porównaniu do 35% wskazujących na stymulację hormonalną. (Źródło: ORIGIO product information)

produkcje nie występują bakterie czy endotoksyny (toksyny pochodzenia bakteryjnego), których obecność może mieć negatywny wpływ na rozwój zarodka.

Ze względu na swoją szczególną rolę w procesie terapii niepłodności, podłoża używane w technikach *in vitro* są jednym z kluczowych elementów mogących stanowić o sukcesie bądź porażce terapii. W opracowaniu ich składu stosuje się dziś najnowsze metody biologii molekularnej, a nad ich udoskonaleniem pracuje wielu wybitnych specjalistów i naukowców na całym świecie. Stosowane regulacje Unii Europejskiej, jak również zaawansowane metody kontroli jakości mediów pozwalają zapewnić możliwie najwyższy stopień bezpieczeństwa dla zarodków w laboratoriach *in vitro*. Więcej informacji na temat jakości podłoży stosowanych w klinikach leczenia niepłodności znajdują Państwo w kolejnym artykule.

### Piśmiennictwo:

- Behr 1999 Blastocyst culture and transfer *Human Reproduction* 14(1):5
- Biggers *et al* (1957) The study of growth factors in tissue culture. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11, 264
- Biggers *et al* 2005 One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? *Human Reproduction* 20(12):3376
- Blake *et al* 2004 The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a Cochrane review. *Human Reproduction* 19(4): 795
- Gardner & Lane 1997 Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction Update* 3(4):367
- Gardner & Lane 2003 Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 6: 470
- Gardner *et al* 2003 Sequential media used in human IVF do not affect imprinting of the H19 gene in mouse blastocysts. *Fertility and Sterility* 80 suppl.3:256
- Gardner *et al* 2004 (Eds) Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Taylor & Francis, London, p. 217
- Lane *et al* 2003 Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 60: 407
- Lawitts & Biggers 1991 Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *Journal of Reproduction and Fertility* 91:543
- Macklon *et al* 2002 A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for *in-vitro* human blastocyst development *Human Reproduction* 17(19):2700
- Palmstierna & Murkes *et al* 1998 Zona pellucida thickness variation and occurrence of visible mononucleated blastomeres in preembryos are associated with a high pregnancy rate in IVF treatments. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15(2):70
- Puissant *et al* 1987 Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Human Reproduction* 2(8):705
- Rijnders & Jansen 1998 The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13(19):2869
- Roseboom *et al* 1995 The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. *Human Reproduction* 10(11):3035

16. Steer *et al* 1992 The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an *in-vitro* fertilization and embryo transfer programme. *Human Reproduction* 7(1):117
17. Steeves & Gardner 1999 Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture *Biology of Reproduction* 61:731
18. Summers & Biggers 2003 Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update* 9(6):557