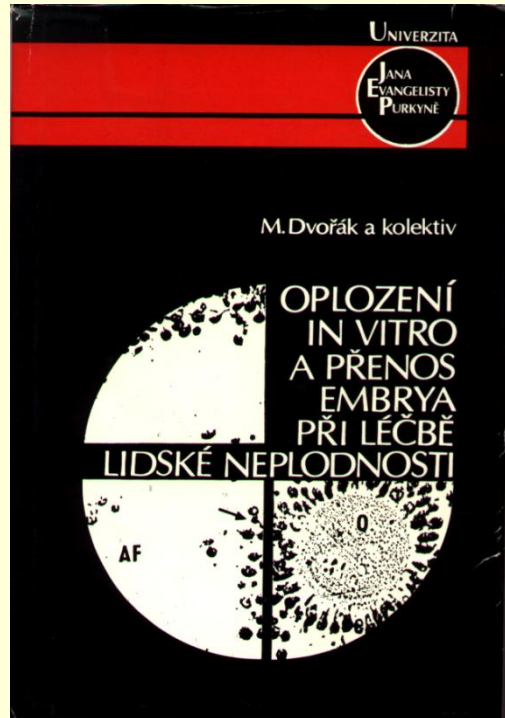


# Faktory ovlivňující úspěšnost embryologické laboratoře

P. Trávník



# Úspěšnost AR ovlivňuje řada faktorů, něco jsme věděli, některé jsme poznali v průběhu let



1990

## OPLOZENÍ IN VITRO A KULTIVACE EMBRYÍ

TRÁVNÍK P.

Dplození lidských vajíček a jejich kultivace do stadia, kdy pravděpodobnost úspěšného vývoje v děloze po transferu je vysoká, představuje nejnáročnější část celého fertilizačního programu. Vyžaduje naprosto přesné dodržování laboratorních postupů, zejména s ohledem na sterilitu, chemickou čistotu a vyloučení všech faktorů, které mohou negativně ovlivnit gamety nebo časná embrya. I když pokusy s plozením a kultivací lidských vajíček jsou staré (Rock a Menkin, 1946), teprve v posledních letech v poznání metabolismu savčích vajíček a spermií a vývoji laboratorní techniky umožnil první úspěšné experimenty v této oblasti (Edwards a spol., 1969), které postupně vedly ke klinickým výsledkům, narození prvního dítěte počatého in vitro a jeho přenosu do mateřského organismu (Stepoe a Edwards, 1978).

V této kapitole se budeme zabývat prostředím, v němž probíhá proces oplození a dalšího vývoje, dále postupem při oplození a průběhem kultivace in vitro až do okamžiku transferu embrya.

### Kultivační prostředí

Kultivační prostředí zajišťuje spermii, oocytům a časným embryím potřebné podmínky pro jejich metabolismus a funkce spojené s oplozením a embryonálním vývojem. Je představováno tekutým kultivačním médiem, saturovaným plynou, v němž jsou jednotlivé plyny zastoupeny příslušnými parciálními tlaky. Zahnuje se ovlivňuje, v nichž kultivace probíhá a všechny nádoby a nástroje, s nimiž přichází do styku kultivační medium, gamety a embrya. Stálé složení plynné fáze a teplota kultivace zajišťuje kultivační systém.

### Kultivační medium

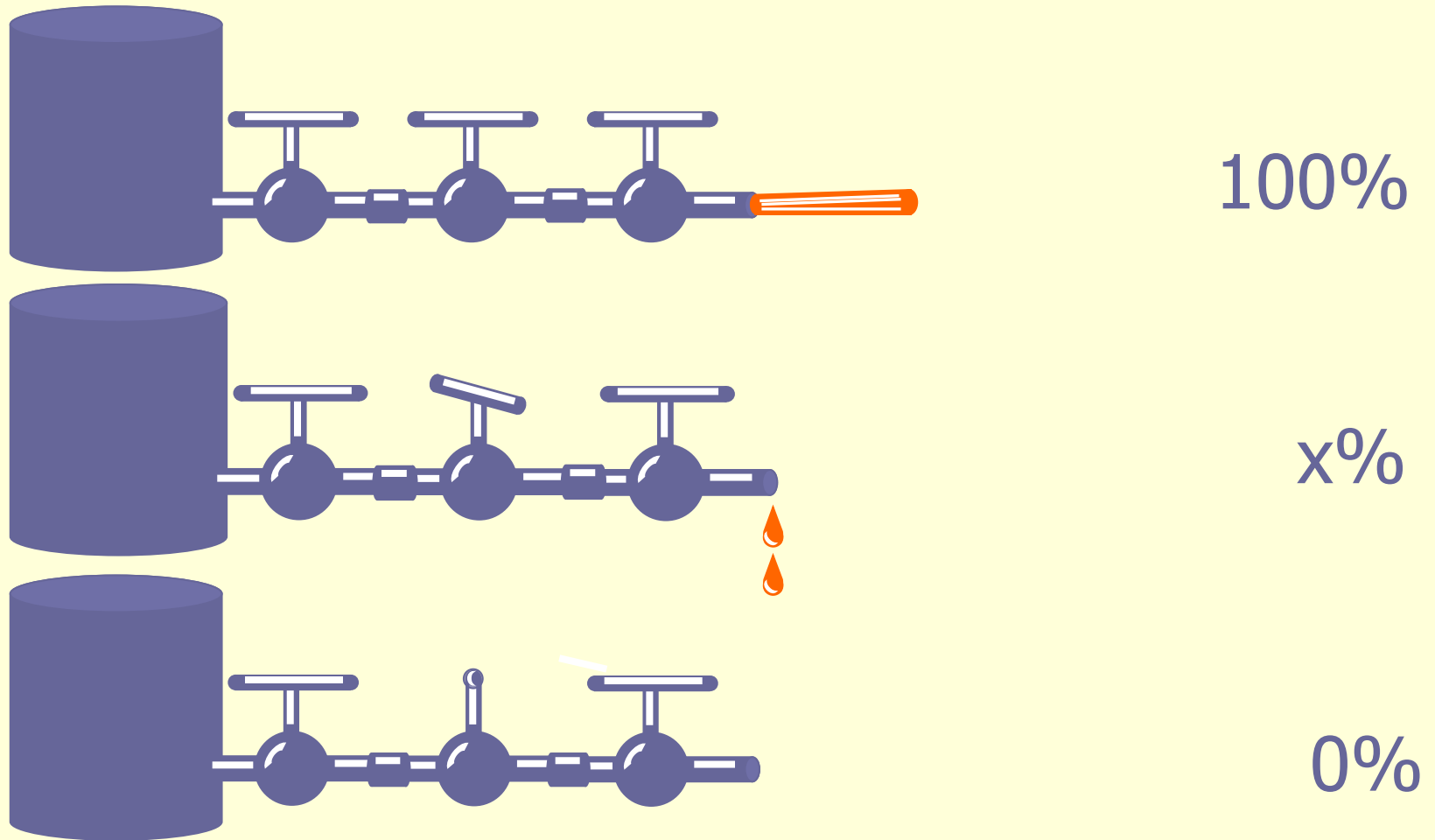
Základem všech kultivačních medií, používaných pro oplození lidského oocytu a kultivaci embryí je hydrogencarbonátový pufr. Je vhodný jednak proto, že jak metabolismus savčího vajíčka (Mahadevan a spol., 1986), tak spermií (Okamura a spol., 1986) je závislý na hydrogencarbonátovém iontu, jednak proto, že jiné látky používané běžně k pufování roztoků mají ve vyšších koncentracích nepříznivý vliv na savčí vajíčka. Jde například o fosforečnan (Brinster, 1969, Mahadevan a spol., 1986) a TRIS (Brinster, 1969). Vhodné rozmezí pH, to je hodnota kolem 7,2, je zajištěno při koncentraci hydrogencarbonátu přibližně 20 mmol/l a parciálním tlakem oxidu uhličitého 5 kPa (5% zastoupení ve směsi plynů). Pro krátkodobé udržení pH je vhodný i pufr založený na HEPES, protože ten savčí vajíčka nepoškozují (Mahadevan a spol., 1986).

Dalšími složkami kultivačního média jsou základní kationty a anionty v koncentraci obdobné jako v krevním séru. Někteří autoři doporučují vyšší koncentraci

85



# Úspěšnost AR ovlivňuje řada nezávislých faktorů



# Úspěšnost AR ovlivňuje řada nezávislých faktorů

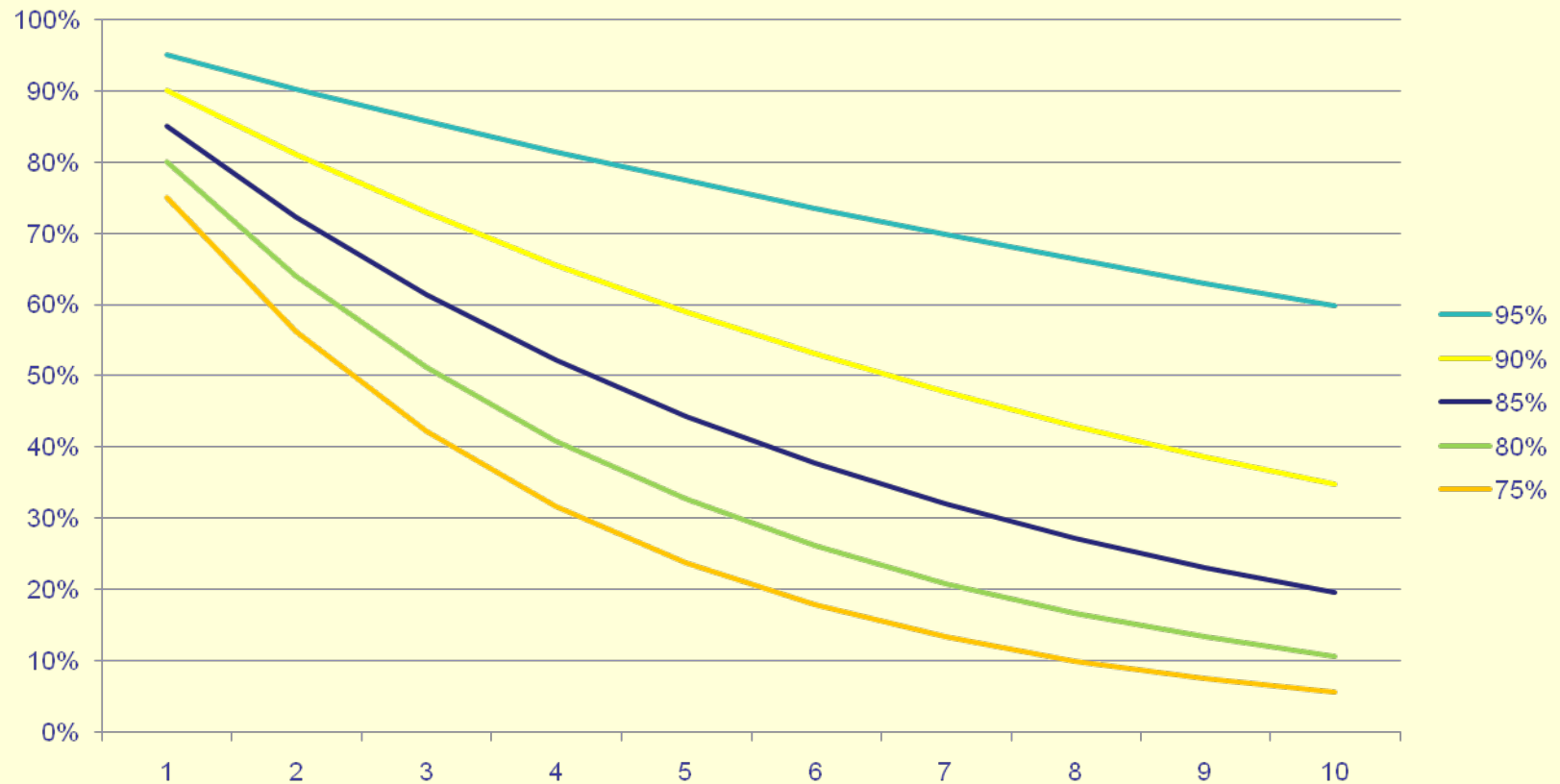
$$p = p_1 \cdot p_2 \cdot p_3 \cdot p_4 \cdot p_5 \dots$$

Průměrná úspěšnost	95 %	90 %	85 %	80 %	75 %
Počet faktorů	Výsledná úspěšnost				
1	95 %	90 %	85 %	80 %	75 %
2	90 %	81 %	72 %	64 %	56 %
3	86 %	73 %	61 %	51 %	42 %
4	81 %	66 %	52 %	41 %	32 %
5	77 %	59 %	44 %	33 %	24 %
6	74 %	53 %	38 %	26 %	18 %
7	70 %	48 %	32 %	21 %	13 %
8	66 %	43 %	27 %	17 %	10 %
9	63 %	39 %	23 %	13 %	8 %
10	60 %	35 %	20 %	11 %	6 %



# Úspěšnost AR ovlivňuje řada nezávislých faktorů

$$p = p_1 \cdot p_2 \cdot p_3 \cdot p_4 \cdot p_5 \dots$$



# Úspěšnost AR ovlivňuje řada faktorů, základní přehled endogenních faktorů

Kvalita oocytů – genetické faktory, epigenetické faktory, stáří ...

Kvalita spermií – genetické faktory, epigenetické faktory , stáří ...



# Úspěšnost AR ovlivňuje řada faktorů, základní přehled **exogenních faktorů**

Optimální složení médií

Optimální kultivační prostředí

Kvalita materiálů

Toxikologická a mikrobiologická kvalita prostředí

Aseptický postup

Kvalita práce embryologa



# Úspěšnost AR ovlivňuje řada faktorů, řadu z nich známe

teplota

pH (koncentrace oxoniových kationtů)

koncentrace oxidu uhličitého

osmotická koncentrace

složení kultivačního média

viditelné světlo ?

koncentrace kyslíku ?

ionty těžkých kovů

bakteriální endotoxiny

organické toxiny (desinfekce, plasty)

ozón

UV záření

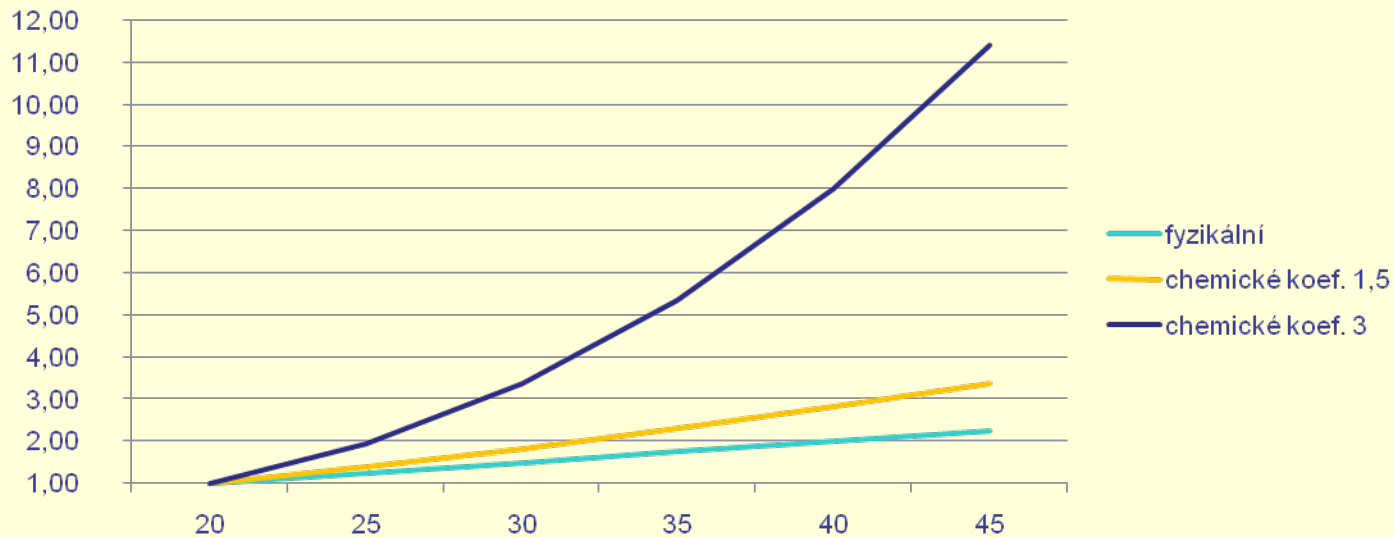




# Teplota

Vliv teploty v reverzibilním rozsahu (do 38°C)

fyzikální jevy (difúze, osmóza), chemické jevy (enzymové reakce)



Vliv teploty v ireverzibilním rozsahu (nad 38°C)

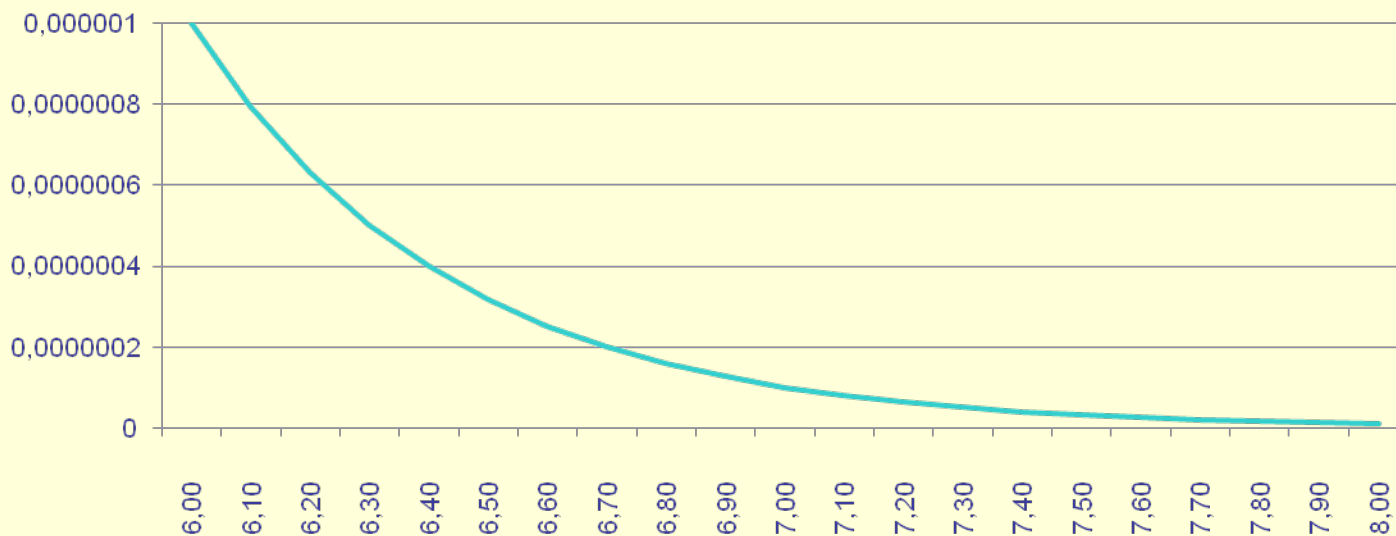
denaturace proteinů, změny struktury lipidů, změny nukleových kyselin



# pH (koncentrace oxoniových kationtů)

Vliv pH v reverzibilním rozsahu (7,0-7,8 ?)

fyzikální jevy (disociace molekul), chemické jevy (enzymové reakce)



Vliv pH v ireverzibilním rozsahu

denaturace proteinů, změny struktury lipidů, změny nukleových kyselin

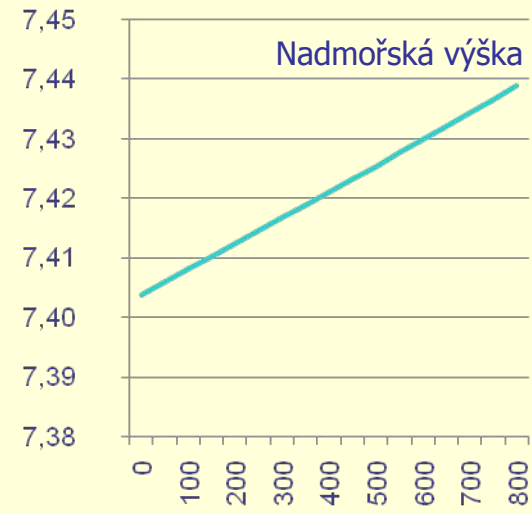
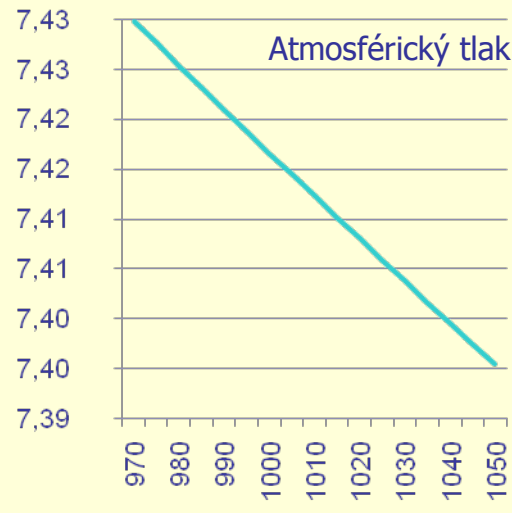
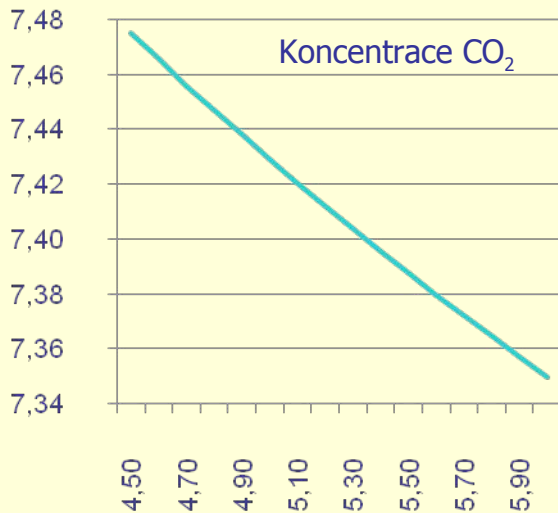


# Koncentrace oxidu uhličitého

## Hydrogenkarbonátový pufr

$$\text{pH} = 6,1 + \log (c / 0,225 p)$$

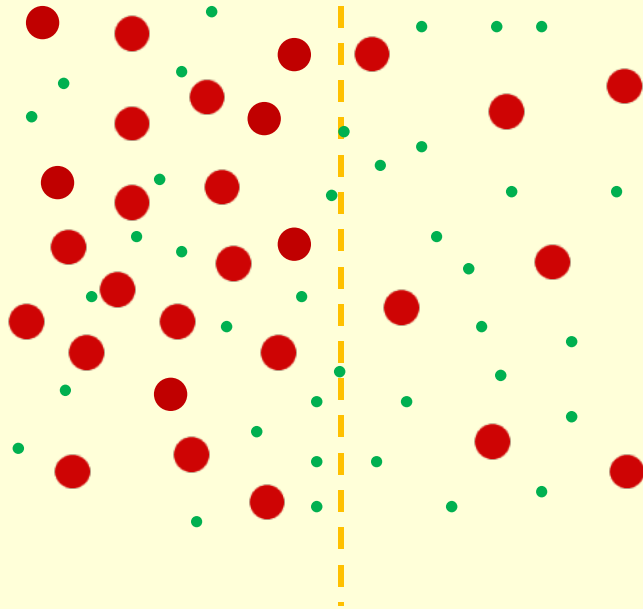
c je koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  v mmol/l, p je parciální tlak  $\text{CO}_2$  v kPa



Hydrogenkarbonátový iont je metabolicky nezbytný pro metabolismus spermií a embryí



# Osmotická koncentrace



molekulární koncentrace 280 – 290 mmol/l



# Koncentrace kyslíku, volné radikály, ozón

Vliv koncentrace molekulárního kyslíku nejasný

Volné radikály – možnost částečného odstranění (kyselina askorbová, glutathion ...)

Ozón – **zničující vliv** – cave UV záření v embryologické laboratoři



# UV záření, viditelné světlo

UV záření – vznik ozónu ze vzdušného kyslíku, vznik volných radikálů, přímý mutagenní účinek

Viditelné světlo ?



# Složení kultivačního média

Voda

Anorganické ionty

Pufry

Energetické zdroje

L - aminokyseliny

Nukleotidy – puriny a pyrimidiny

Hydrogenkarbonátový a fosfátový anion

Makromolekulární složky - albumin

Růstové faktory, vitaminy, koenzymy

Antibiotika

Pomocné látky – úprava osmotického tlaku, indikátory



# Anorganické ionty

$\text{Na}^+$  - osmotický tlak, membránový potenciál ...

$\text{K}^+$  - membránový potenciál, enzymatická aktivita ...

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  - stabilita membrán, stabilita nukleových kyselin, enzymatická aktivita, mezibuněčná spojení

mikroprvky





# Pufry

hydrogenkarbonátový – netoxický, nutná přítomnost oxidu uhličitého

HEPES – málo toxický, není nutná přítomnost oxidu uhličitého, vhodný pro manipulace

fosfátový – vysoká koncentrace fosfátu toxická pro řadu savčích embryí



# Energetické zdroje

pyruvát, laktát, fosfoenolpyruvát

glukóza – ve fertilizačních médiích pro spermie, v blastocystových médiích



# Růstové faktory, vitaminy, koenzymy

Vitaminy

Koenzymy

Růstové faktory a hormony

Inzulin

Insulin-like growth factor-1

Epidermal growth factor

Platelet-derived growth factor

Transforming growth factor alpha

Transforming growth factor beta

GnRH



Úspěšnost AR ovlivňuje řada faktorů,  
přesto dosahujeme slušných výsledků



Tohle byl první !

