

METODY ZAPŁODNIENIA *IN VITRO*

Rafał P. Piprek (Kraków)

W obecnych czasach niepłodność staje się coraz częstszym, narastającym z roku na rok, problemem. Obecnie trudności z zajściem w ciążę dotyczą 15-20% par, przez co WHO uznało niepłodność za chorobę cywilizacyjną. Niepłodność stwierdza się, gdy dwunastomiesięczny okres intensywnego starania się o potomstwo nie doprowadza do zajścia w ciążę. Często niepłodność niesłusznie jest nazywana bezpłodnością, która jest w rzeczywistości całkowitą i trwałą niezdolnością do wydania potomstwa na świat. Współczesna medycyna dysponuje metodami umożliwiającymi niepłodnym parom zajście w ciążę. W Polsce rośnie liczba klinik leczenia niepłodności, w których oferuje się najnowocześniejsze techniki wspomaganie rozrodu, tak zwane ART (ang. *Assisted Reproductive Technology*).

Przyczyny niepłodności

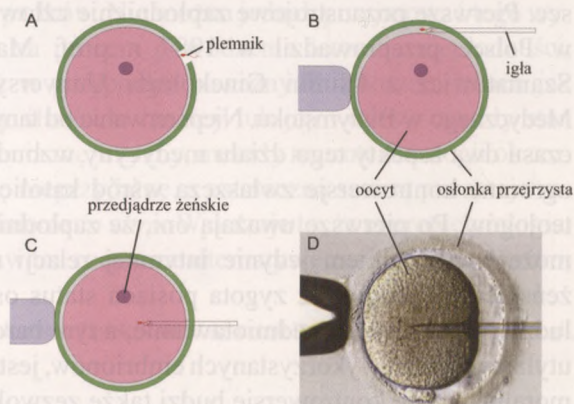
Leczenie niepłodności rozpoczyna się od zebrania szczegółowego wywiadu oraz przeprowadzenia badań diagnostycznych, mających na celu ustalenie przyczyn zaburzeń. U około 35% przypadków problem niepłodności leży po stronie kobiety, i także u 35% po stronie mężczyzny. Wśród 30% par przyczyna niepłodności jest po stronie obojga partnerów bądź jest nieznana (niepłodność idiopatyczna). Najczęstszymi przyczynami trudności zajścia w ciążę są problemy z owulacją, mające podłoże hormonalne, a także niedrożność jajowodów. Pozostałe przyczyny niepłodności kobiet to wady śluzówki macicy (czyli tak zwane zmiany endometriotyczne), mięśniaki macicy, alergia na nasienie partnera lub blokada psychiczna. U podstaw niepłodności mężczyzn leży pogarszający się stan nasienia, wynikający ze złego trybu życia i wzrastającego poziomu substancji szkodliwych w środowisku, takich jak ftalany, pestycydy i syntetyczne estrogeny. U coraz większej liczby mężczyzn plemniki wykazują wady morfologiczne, zaburzenia w ruchliwości; odnotowuje się także ogólny spadek liczby plemników w ejakulacji. Przyczynami takiego zjawiska, oprócz zanieczyszczeń środowiska, są także mutacje o charakterze mikrodelecji występujące w pewnym regionie długiego ramienia chromosomu Y, który zawiera geny odpowiedzialne za

proces spermatogenezy. Mutacje takie wykrywa się u około 5-15% mężczyzn z wyjątkowo słabą kondycją nasienia. Spłodzenie potomstwa uniemożliwiają także niekiedy wady anatomiczne, takie jak żylaki powrózka nasiennego bądź zaburzenia fizjologiczne i psychiczne, jak impotencja. Z kolei społeczny problem przyczyniający się do zwiększenia odsetka par niepłodnych wynika z odkładania decyzji o zajściu w ciążę poza okres największej płodności fizjologicznej.

Najprostsze metody leczenia niepłodności

Jeżeli przyczyna leży po stronie kobiety ratunku poszukuje się w podawaniu leków regulujących cykl hormonalny. Czasami wystarcza nawet zwykła zmiana diety, która może przywrócić regularność cyklu miesięcznego. Wykorzystuje się także metody farmakologiczne zwiększające ukrwienie miednicy małej i narządów rodnych. Wykonuje się badania ultrasonograficzne (USG) pozwalające monitorować owulację oraz określić stan jajowodów w celu przeprowadzenia ewentualnego zabiegu ich udrażniania. Gdy przyczyna leży po stronie mężczyzny zwykle podaje się preparat hormonalny z testosteronem, stymulujący gruczoły płciowe do intensywniejszej pracy. Niekiedy anomalie anatomiczne bądź bardzo zły stan nasienia stwarzają konieczność pobrania plemników z najądrzy (MESA, ang. *Micro-Epididymal Sperm Aspiration*, czyli mikrochirurgiczna aspiracja plemników z najądrzy) lub z jąder za pomocą biopsji (TESE, ang. *Testicular Sperm Extraction*, czyli izolacja plemników jądrowych). Pobrane i odpowiednio przygotowane nasienie wprowadza się za pomocą cewnika do jamy macicy kobiety, wykonując tak zwaną sztuczną inseminację (IUI, ang. *Intrauterine Insemination*), która zwykle skutkuje zapłodnieniem wewnątrzustrojowym (*in vivo*). Zabieg taki zapewnia ominięcie śluzu szyjki macicy, który może zawierać przeciwciała przeciwko białkom plemników powodujące aglutynację tych komórek. Ponadto śluz stanowi barierę dla wędrujących plemników, która może okazać się nie do pokonania przez plemniki o upośledzonej ruchliwości. W celu określenia czy śluz szyjki macicy zawiera przeciwciała szkodliwe dla plemników przeprowadza się test penetracji śluzu (MPT). Niekiedy organizm

mężczyzny produkuje przeciwciała skierowane przeciwko białkom swoich własnych plemników. W przypadku takiej niepłodności immunologicznej konieczne jest przeprowadzenie około trzyletniego leczenia hamującego wydzielanie określonych przeciwciał. Gdy użyte do sztucznej inseminacji nasienie pochodzi od partnera (np. męża) zabieg ten nazywany jest sztuczną inseminacją homologiczną, AIH (ang. *Artificial Isemination Husband or Homologous*), natomiast gdy nasienie pochodzi od innego dawcy jest to tzw. sztuczna inseminacja heterologiczna, AID (ang. *Artificial Isemination Donor*).



Ryc. 1. Metody zapłodnienia in vitro (IVF). A. Częściowe przerwanie ciągłości osłonki przejrzystej oocyty (PZD). B. Wstrzyknięcie plemnika pod osłonkę przejrzystą (SUZI). C. Docytoplazmatyczne wstrzyknięcie plemnika (ICSI). D. Fotografia zabiegu ICSI.

Metody zapłodnień *in vitro*

W przypadku zaburzeń owulacji u kobiety konieczne może być pobranie (aspiracja) oocytów z jajnika, po czym wystarcza niekiedy samo wprowadzenie oocyty i plemników do jajowodu kobiety, czyli tak zwane GIFT (ang. *Gamete Intrafallopian Transfer*), które jest medycznie wspomaganym zapłodnieniem wewnątrzustrojowym. Gdy około 6 prób sztucznej inseminacji nie skutkuje powodzeniem, sięga się po metody zapłodnienia pozaustrojowego (ang. IVF, *In Vitro Fertilization*). Po wykonaniu zapłodnienia *in vitro*, uzyskane zygoty wprowadza się do jajowodu matki. Metoda ta zwana jest także w skrócie FIVET (ang. *Fertilization In Vitro - Embryo Transfer*). W najprostszym przypadku zapłodnienie IVF przeprowadza się przez wprowadzenie plemników do szalki z pożywką zawierającą oocyty. Jednak gdy plemniki mężczyzny są zbyt mało liczne, posiadają wady morfologiczne lub są mało ruchliwe, konieczne jest wykorzystanie mikrochirurgicznych zabiegów umożliwiających proces połączenia gamet. Najprostszym zabiegiem jest częściowe przerwanie ciągłości osłonki przejrzystej oocyty (ryc. 1A). Osłonka przejrzysta jest cienką warstwą galaretowatej substancji otaczającej

oocyt. Stanowi ona barierę przed zapłodnieniem przez większą liczbę plemników, dlatego zabiegi przerywające jej ciągłość często kończą się polispermicznym zapłodnieniem, czyli wniknięciem kilku plemników. Bardziej zaawansowana metoda sztucznego zapłodnienia polega na wprowadzeniu kilku dojrzałych plemników pod osłonkę przejrzystą (ryc. 1B). Także ten zabieg może skończyć się polispermicznym zapłodnieniem i wymaga użycia impulsu elektrycznego dla wniknięcia plemnika do oocyty. Najkorzystniejsza okazała się metoda wstrzyknięcia plemnika wprost do oocyty za pomocą cienkiej igły (ryc. 1C, D). Ta technika sztucznego zapłodnienia pozaustrojowego zwana jest docytoplazmatycznym podaniem plemnika. Wymaga ona użycia wyspecjalizowanych narzędzi mikromanipulacyjnych i jest przeprowadzana w przypadku bardzo słabej jakości nasienia oraz w przypadku wcześniejszych niepowodzeń przy stosowaniu metod wspomaganego rozrodu. Technika ta została udoskonalona przez wykorzystanie mikroskopu umożliwiającego ocenę morfologii plemników na ekranie monitora w powiększeniu 6000 razy. Pozwala to na wyselekcjonowanie najlepszego plemnika przed wstrzyknięciem go do oocyty. Metoda docytoplazmatycznego podania wyselekcjonowanych morfologicznie plemników została opracowana w Izraelu; w Polsce wprowadzili ją dr n. med. Krzysztof Grettka oraz dr n. med. Mariusz Kiecka. Obecnie wykorzystuje się także komputerową analizę nasienia umożliwiającą zbadanie koncentracji, morfologii, ruchliwości i żywotności plemników, a także określenie stanu materiału genetycznego zawartego w plemnikach. Jest to ważne, gdyż nawet morfologicznie i ruchowo prawidłowe plemniki mogą nieść wady genetyczne zaburzające wczesny rozwój zarodkowy. U mężczyzn z całkowitym brakiem plemników można wykorzystać okrągłe spermatozojy pobrane z jąder, które są haploidalnymi prekursorowymi komórkami plemników. Jednak zapłodnienie komórkami prekursorowymi lub niedojrzałymi plemnikami wyizolowanymi z jąder wiąże się ze szczególnym ryzykiem zaburzeń rozwojowych, związanych z nieprawidłową ekspresją genów imprintowanych (piętnowanych) warunkujących między innymi rozwój somatyczny płodu. Bowiem po zapłodnieniu dochodzi do epigenetycznej modyfikacji chromatyny, a tym samym do zmiany ekspresji genów imprintowanych.

W celu przeprowadzenia zapłodnienia *in vitro* konieczne jest przeprowadzenie aspiracji oocytów, czyli wyizolowanie tych komórek z jajników kobiety. Przygotowanie kobiety do aspiracji oocytów rozpoczyna się zwykle od podania podwzgórzowego hormonu zwanego gonadoliberyną (GnRH)

w postaci zastrzyku bądź aerozolu do nosa. Hormon ten doprowadza do zahamowania wzrostu pęcherzyków jajnikowych zawierających oocyty. Następnie rozpoczyna się codzienne podawanie folikulotropowego hormonu przysadkowego (FSH) w zastrzykach, który pobudza pęcherzyki jajnikowe do zsynchronizowanego wzrostu. W tym czasie monitoruje się wzrost pęcherzyków oraz śluzówki macicy za pomocą USG. Gdy pęcherzyki są wystarczająco duże (18–20 mm) podaje się domięśniowo gonadotropinę kosmówkową (hCG) na 36 godzin przed pobraniem oocytów. Hormon ten doprowadza do zakończenia wzrostu pęcherzyków, indukując owulację. Przed aspiracją oocytów podaje się pacjentce środki uspokajające i znieczulające. Pobrania oocytów dokonuje się za pomocą cienkiej dwukanałowej igły wprowadzanej do jajnika przez sklepienie pochwy. Jednocześnie monitoruje się jajniki za pomocą USG. Narzędzie pomaga opłukiwać dojrzałe pęcherzyki jajnikowe (pęcherzyki Graafa) i odciągać płyn wraz z oocytami, które następnie są odławiane, selekcjonowane i umieszczane w specjalnej pożywce. Obecnie możliwa jest także technika badania materiału genetycznego komórek jajowych. Wykorzystuje się w tym celu ciałka kierunkowe, które zawierają chromosomy matki odrzucone w czasie mejozy z oocyty. W dniu aspiracji oocytów partner oddaje nasienie po 3-5 dniach wstrzemięźliwości seksualnej i alkoholowej. Plemniki poddawane są badaniom i umieszczane w mediach odżywczych oraz oczyszczających. Po kilku godzinach inkubacji oocytów i plemników przeprowadza się zapłodnienie np. poprzez wszczepienie plemnika. Po zapłodnieniu zygoty są inkubowane przez 16–20 godzin, po czym embriolog ocenia ich stan. Zazwyczaj po 2–3 dobach wprowadza się wyselekcjonowane zarodki do macicy kobiety. Zwykle liczba wykorzystywanych zarodków wynosi od 2–3, co ma na celu zwiększenie szans powodzenia zabiegu. Wprowadzane są największe embriony (stadium 6 lub 8 blastomerów), gdyż takie mają największe szanse implantacji w śluzówce macicy. Zabieg przeprowadza się przy wypełnionym pęcherzu moczowym, co ułatwia monitorowanie umieszczenia zarodków w macicy. Kobiecie podaje się też w tym czasie progesteron, który zwiększa szanse implantacji zarodków. Po 2 tygodniach wykonuje się test ciążowy w celu oceny rezultatów zabiegu. Niewykorzystane zarodki można zamrażać w ciekłym azocie, podobnie jak nasienie, z przeznaczeniem do ewentualnego wykorzystania w przyszłości. W USA przechowuje się obecnie około 500 tys. zamrożonych embriionów. Z kolei na przykład w Niemczech i we Włoszech po aspiracji można stworzyć maksymalnie 3 embriiony, z czego wszystkie muszą zostać wszczepione

matce. Tego typu zasady postępowania są oparte na odpowiednich regulacjach prawnych obowiązujących w danym kraju.

Słów kilka o historii i problemach z zapłodnieniem *in vitro*

Pierwszym dzieckiem poczętym metodą *in vitro* była Louise Brown urodzona w 1978 roku w Wielkiej Brytanii. Od tamtego czasu na świat przyszło około półtora miliona dzieci poczętych sztucznymi metodami; w tym około dwóch tysięcy dzieci w Polsce. Pierwsze pozaustrojowe zapłodnienie człowieka w Polsce przeprowadził w 1987 r. prof. Marian Szamatowicz z Kliniki Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Nieprzerwanie od tamtego czasu dwa aspekty tego działu medycyny wzbudzają ogromne kontrowersje zwłaszcza wśród katolickich teologów. Po pierwsze uważają oni, że zapłodnienie może być wynikiem jedynie intymnej relacji małżeńskiej; po drugie już zygota posiada status osoby ludzkiej, przez co uprzedmiotawianie, a tym bardziej użyczenie niewykorzystanych embriionów, jest niemoralne. Spore kontrowersje budzi także zezwolenie w Wielkiej Brytanii na tworzenie zarodków ludzkozwierzęcych w celach naukowych.

Niezwykle istotne są badania wpływu zapłodnienia *in vitro* na rozwój organizmu, gdyż okazuje się, że metody rozrodu wspomaganego (ART) wiążą się z pewnymi powikłaniami. Dane rejestrów medycznych pozwalają uznać metody sztucznego zapłodnienia za bezpieczne dla zdrowia potomstwa. Stwierdzono jedynie, że dzieci poczęte metodami rozrodu wspomaganego przychodzą na świat nieco wcześniej niż w przypadku ciąż spontanicznych i częściej charakteryzują się obniżoną masą urodzeniową. Cięższe wielopłodowe są największym ryzykiem zapłodnień *in vitro*. Badania pokazują, że w przypadku technik wspomaganego rozrodu nieznacznie wzrasta ryzyko wystąpienia wad rozwojowych, często bezpośrednio związanych z samymi przyczynami niepłodności rodziców. Otóż wrodzony brak nasieniowodów jest związany z genem *CFTR*, którego mutacja powoduje także mukowiscydozę. Jednak 2/3 mężczyzn z brakiem nasieniowodów nie ma objawów mukowiscydozy, dlatego też mężczyźni z takimi wadami powinni być poddawani badaniom genu *CFTR* w celu wykluczenia ryzyka wystąpienia mukowiscydozy u potomstwa. Ponadto istnieją przesłanki wskazujące, że zapłodnienia *in vitro* podwyższają ryzyko wystąpienia bardzo rzadkich chorób wynikających z zaburzeń w epigenetycznej regulacji ekspresji genów. Należą tutaj, takie schorzenia jak zespół Beckwith-Wiedemanna,

zespół Angelmana, zespół Pradera-Williego, a także nowotwory takie jak siatkówczak.

Trzydzieści lat temu stworzona została tak zwana naprotechnologia (ang. *Natural Procreative Technology*), która nie jest niczym innym jak tylko techniką diagnozowania i leczenia niepłodności znanymi już metodami medycyny, jednak z wyłączeniem zapłodnienia *in vitro*. Podstawą naprotechnologii jest prowadzenie dokładnych obserwacji kobiecego organizmu i tworzenie indywidualnych programów terapeutycznych. Okazuje się, że metody te pozwalają na zdiagnozowanie przyczyn niepłodności w około 97% przypadków. Nie można jednak przyjmować tego wyniku za procent powodzenia leczenia niepłodności, gdyż w przypadku poważnych schorzeń, takich jak wady śluzówki macicy lub jajowodów, czy zły stan nasienia męzczyzny, metody naprotechnologii okazują się nieprzydatne, a ostateczną szansą pozostaje zapłodnienie *in vitro*. Wskazuje to, że naprotechnologia, uznawana często za alternatywę zapłodnienia *in vitro*,

okazuje się nieprzydatną dla 60% par niepłodnych. Tymczasem zapłodnienie *in vitro* jest potencjalnie pomocne w prawie wszystkich przypadkach, mimo, że szanse powodzenia sztucznych zapłodnień wynoszą między 30 a 40%.

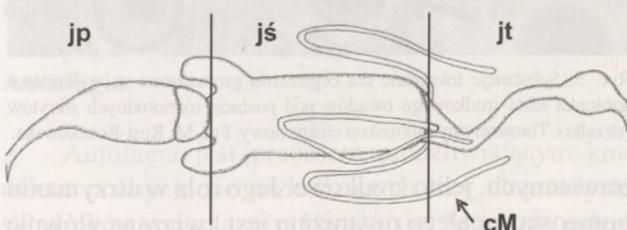
Na zakończenie należy także dodać, że zapłodnienie *in vitro* okazało się niezwykle przydatne w nauce, między innymi dla tworzenia organizmów transgenicznych, umożliwiając badania funkcji genów oraz skutków ich mutacji. Doświadczenia klinik pokazują, że niepowodzenia metod wspomaganego rozrodu są bardzo rzadkie i co ważniejsze wiadomo, że udoskonalenie umiejętności przeprowadzania pozaustrojowych zapłodnień umożliwiło posiadanie potomstwa parom, dla których wcześniej było to niemożliwe. Przez to technika zapłodnienia *in vitro* powinna być dostępna dla par niepłodnych, a zdecydowanie się na sztuczne zapłodnienie lub zaufanie metodom naprotechnologii powinno być zgodne z sumieniem danej osoby chcącej wydać na świat potomstwo.

■ Rafał P. Piprek, Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków. E-mail: rafalpiprek@wp.pl

TAJEMNICE ŚMIERCI OWADZIEGO JELITA

Magdalena M. Rost-Roszkowska (Katowice)

Owady są najliczniejszą grupą zwierząt zasiedlających zarówno środowisko lądowe, jak i słodkowodne. Przystosowały się one także do odżywiania się różnorodnym pokarmem (np. tkanki roślinne, czy zwierzęce, soki roślinne, krew). Pomimo olbrzymich różnic w sposobie żerowania i rodzaju spożywanego pokarmu układ pokarmowy wszystkich owadów zawsze składa się z trzech części: jelita przedniego (pochodzi z ektodermy), środkowego (z endodermy) i tylnego (także z ektodermy), chociaż u różnych grup są one zróżnicowane pod względem morfologicznym i fizjologicznym (ryc. 1). Poszczególne odcinki wyścielone są nabłonkiem jednowarstwowym płaskim, sześciennym bądź cylindrycznym, a kształt jego



Ryc. 1. Układ pokarmowy owada: jelito przednie (jp), jelito środkowe (js) oraz jelito tylne (jt). Cewki Malpighiego (cM).

komórek jest często związany z rozmiarami ciała zwierzęcia, bądź też z aktywnością komórek w danym momencie. Jelito środkowe jest odpowiedzialne za trawienie, sekrecję, absorpcję, a u owadów pozbawionych cewek Malpighiego także za wydalanie. Ze względu na fakt, że stanowi ono dla organizmu pierwszą barierę przed szkodliwym wpływem środowiska zewnętrznego, jego budowa oraz funkcjonowanie od wielu lat budzi zainteresowanie badaczy.

Nabłonek jelita środkowego (ryc. 2) u większości owadów tworzony jest przez spoczywające na bezkomórkowej błonie podstawnej komórki trawienne oraz komórki regeneracyjne. U wielu grup Insecta opisano także występowanie komórek endokrynowych i kubkowych (ryc. 3). Komórki nabłonkowe są głównym elementem nabłonka jelita środkowego i odpowiadają za wszystkie jego funkcje związane z trawieniem i wchłanianiem. Komórki regeneracyjne występują pomiędzy komórkami nabłonka pojedynczo, bądź tworzą skupiska nazywane gniazdami lub kryptami regeneracyjnymi (ryc. 4). Są one zdolne do intensywnych podziałów oraz różnicowania się w komórki tworzące nabłonek jelita środkowego,