

**Dr hab.****Anna Ajduk**

pracuje w Zakładzie Embriologii Wydziału Biologii UW. Od ponad 10 lat, pracując na modelu myszy, zajmuje się tematyką zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego ssaków, także w kontekście optymalizacji procedur zapłodnienia in vitro.

Obecnie prowadzi m.in. badania nad wpływem procesu starzenia na jakość komórek jajowych i zarodków oraz nad wykorzystaniem optycznej mikroskopii koherencyjnej (OCM) w biologii i medycynie reprodukcyjnej.

Jej badania zostały uhonorowane w 2013 r. Nagrodą im. prof. Stefana Pieńkowskiego przyznawaną za wybitne osiągnięcia w naukach matematyczno-przyrodniczych.

Jest beneficjentką programów Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, Narodowego Centrum Nauki, Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, Schering Foundation i FEBS.

Przewodnicząca Akademii Młodych Uczonych w IV kadencji.

aajduk@biol.uw.edu.pl



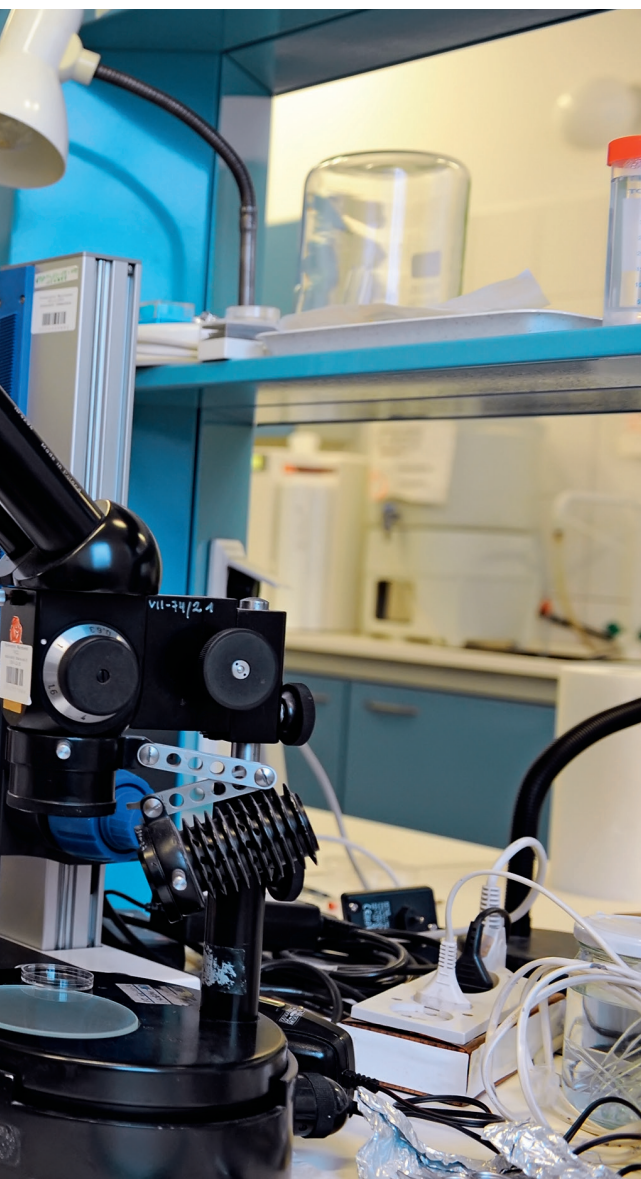
# SZKLANA NADZIEJA

**ACADEMIA: Co oznacza termin in vitro?**

ANNA AJDUK: In vitro oznacza po prostu „w szkle” i odnosi się do wszystkich technik wymagających hodowania komórek albo prowadzenia doświadczeń w warunkach laboratoryjnych, poza organizmem. Zapłodnienie in vitro, czyli inaczej zapłodnienie pozaustrojowe, polega na przeprowadzeniu procesu połączenia się żeńskiej i męskiej komórki rozrodczej,

który normalnie zachodzi w drogach rodnych kobiety, w warunkach laboratoryjnych. Najpierw od kobiety izoluje się komórki jajowe, czyli oocyty, a od mężczyzny plemniki, i następnie albo miesza się je w kropli pożywki, pozwalając plemnikom dotrzeć do oocytów i je zapłodnić, albo – jeśli plemników jest mało czy też są mało ruchliwe – wstrzykuje się je bezpośrednio do komórek jajowych.

DR HAB. ANNA AJDUK



**O** terażniejszości i przyszłości stosowania metody in vitro mówi **dr hab. Anna Ajduk** z Uniwersytetu Warszawskiego.

**Takie mieszanie w kropli pożywki odzwierciedla sytuację naturalną, gdzie do komórki dociera wiele plemników i jeden do niej ostatecznie wnika. Różnica polega więc tylko na tym, że dzieje się to poza organizmem?**

W zapłodnieniu in vitro liczba plemników przypadających na komórkę jajową jest większa niż w warunkach naturalnych. Trzeba pamiętać, że przy natu-

ralnym zapłodnieniu do dróg rodnych kobiety trafia bardzo dużo plemników, ale tylko niewielki odsetek z nich dociera do górnej części jajowodu, gdzie czeka oocyt. Reszta odpada po drodze, traci zdolność do ruchu, jest zatrzymana przez różnego typu mechaniczne przeszkody, ponieważ jajowód nie jest, jak mogłoby się wydawać, prostą rurką – to prawdziwy labirynt. W technice in vitro plemniki mają bardzo ułatwione zadanie.

**Przeciwnicy zapłodnienia in vitro mówią, że w tej technice wybieramy najlepsze komórki, podczas gdy ta naturalna, długa droga to dla plemników test sprawności. Paradoksalnie w sztucznym zapłodnieniu dajemy szansę słabszym plemnikom.**

Tak, w naturze tylko naprawdę zdrowy plemnik ma szansę dotrzeć do oocytu. W sztucznym zapłodnieniu, jeśli po prostu mieszamy plemniki z oocytami, plemniki muszą wykazywać minimum sprawności, żeby przebić się do komórki jajowej – muszą do niej dopłynąć, pokonać przeszkody w postaci otaczających ją tzw. komórek pęcherzykowych czy białkowej otoczki zwanej osłonką przejrzystą. Natomiast w metodzie ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*), polegającej na wstrzyknięciu plemnika bezpośrednio do oocytu, szansę ma każdy plemnik – tu liczy się tylko, czy jego genom nie jest uszkodzony. W przypadku iniekcji bezpośrednio do oocytów możliwe jest nawet wykorzystanie komórek pobranych bezpośrednio z jądra, które nie są jeszcze w pełni wyróżnicowanymi plemnikiem.

**To szansa dla par, w których mężczyzna ma problem z plemnikiem?**

Wykorzystywanie w ICSI komórek niebędących w pełni dojrzałymi plemnikiem to wciąż kontrowersyjna metoda o niskiej skuteczności, znacznie lepiej przebadana u zwierząt niż u ludzi. Dlatego jej zastosowanie rozważa się tylko wtedy, gdy ani w ejakulacie, ani w samych jądrach nie ma w pełni wyróżnicowanych plemników.

Można się spotkać z zarzutem, że zapłodnienie in vitro, ułatwiając plemnikom wniknięcie do oocytu, przyczynia się do przekazania przyszłym pokoleniom genów związanych z niepłodnością. Należy jednak pamiętać, że w dzisiejszych czasach niepłodność męska bardzo często wiąże się nie tyle z uwarunkowaniami genetycznymi, ile z czynnikami środowiskowymi: niezdrowym stylem życia, stresem, zanieczyszczeniem środowiska. Także w przypadku niepłodności żeńskiej czynniki pozagenetyczne, takie jak np. wiek kobiety, są szalenie ważne.

**Wbrew obiegowym opiniom dzieci z in vitro nie różnią się od tych poczętych naturalnie?**

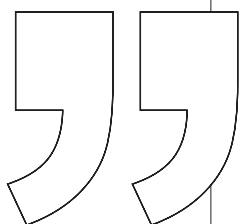
Jak na razie wszystko wskazuje na to, że dzieci poczęte techniką zapłodnienia in vitro są zdrowe. Pamiętajmy

jednak, że najstarsza osoba poczęta tą metodą, Louise Brown, ma dopiero 40 lat, zatem na ocenę długoterminowych skutków tej techniki trzeba jeszcze poczekać.

**Ale można argumentować, że w ten sposób powstają zarodki, które normalnie by nie powstały. Skoro rodzice muszą uciekać się do metody in vitro, to z ich komórkami może być coś nie tak...**

Zarodek powstały w wyniku zapłodnienia in vitro musi przejść cały rozwój w organizmie matki w sposób całkowicie naturalny. Jeżeli rzeczywiście jest z nim „coś nie tak”, np. zbudowany jest z komórek o nieprawidłowej liczbie chromosomów bądź też z innych przyczyn nieprawidłowo funkcjonujących, to się po prostu nie zaimplantuje w macicy lub nie rozwinie. Natura interweniuje na późniejszym etapie.

**No właśnie. Potoczne myślenie jest takie – mamy plemnik i jajeczko, a zaraz potem powstaje dziecko.**



Do niepłodności i korzystania z zapłodnienia in vitro nikt nie chce się przyznać i w związku z tym nie ma też chętnych do dotowania takich badań.

U człowieka jest jeszcze dziewięć miesięcy pomiędzy. Po zapłodnieniu przez pierwszych pięć dni ludzki zarodek rozwija się w naturalnych warunkach w jajowodzie, a w warunkach laboratoryjnych w szalce w inkubatorze. Przy sztucznym zapłodnieniu można wtedy ocenić, czy wszystko jest z nim w porządku. Nawet jeżeli na początku było dużo plemników i ładne komórki jajowe, zapłodnienie poszło dobrze, to zwykle tylko niewielki odsetek zapłodnionych oocytów rozwija się do stadium blastocysty, czyli tego stadium w rozwoju zarodka, kiedy implantuje się on do macicy. A nawet jeśli już zarodek osiągnie stadium blastocysty i zostanie przeniesiony do macicy, to nie zawsze dochodzi do implantacji, nie zawsze ciąża dotrwa do końca. Jak zatem widać, zarodek, nawet powstały na drodze zapłodnienia in vitro, wielokrotnie w czasie swojego rozwoju musi się „wykazać” dobrą jakością.

**A więc to sama natura, a nie osoba wykonująca procedurę, dokonuje selekcji zarodków.**

W dużej mierze tak. Technika zapłodnienia in vitro pomaga w samym połączeniu się gamet, a potem dzieje się już to, co by się działo po zapłodnieniu natural-

nym. Można by się nawet zastanawiać, czy te pierwsze parę dni po zapłodnieniu in vitro, kiedy to zarodek rozwija się w szalce, nie jest dla niego większym wyzwaniem, niż gdyby rozwijał się w organizmie kobiety.

Tak naprawdę, to, nad czym intensywnie pracują obecnie naukowcy, w tym i ja, i moi studenci, to znalezienie najbardziej efektywnego sposobu odczytywania znaków dotyczących jakości zarodka danych nam przez naturę. Chodzi o to, by maksymalnie zwiększyć szanse powodzenia całej procedury i wybrać do transferu do macicy te zarodki, które mają największą zdolność do dalszego rozwoju. A to nie jest takie proste, bo jak już wcześniej mówiłam, nie każda ładna blastocysta zdoła się zaimplantować w macicy i dalej rozwinąć. Przyczyny takich niepowodzeń są oczywiście złożone, ale przynajmniej częściowo wiążą się z tym, że nawet najzdrowiej wyglądający zarodek nie musi mieć wysokiego potencjału rozwojowego. Jakie zatem cechy zarodka najlepiej odzwierciedlają jego zdolność do dalszego rozwoju? To właśnie jest pytanie, które sobie stawiamy. W naszych badaniach sprawdzamy, czy takiej informacji nie może nam dostarczyć analiza dynamiki podziałów komórkowych w zarodku oraz analiza jego właściwości biomechanicznych.

**Można jednak zbadać zarodek przed implantacją także pod kątem wad genetycznych?**

Tak, są to techniki tzw. diagnostyki przedimplantacyjnej. Kiedyś w celu takiej diagnostyki pobierano jeden blastomer, czyli komórkę zarodka, ze stadium ośmiokomórkowego. Jest to możliwe, ponieważ zarodki ssaków mają bardzo duże zdolności regulacyjne i jeśli na tym etapie usunie się pojedyncze komórki, to mimo to zarodek rozwinie się normalnie. Pobieranie pojedynczego blastomeru miało jednak swoje wady. Po pierwsze, była to dość inwazyjna technika i pojawiły się wątpliwości, czy jednak nie osłabia ona potencjału rozwojowego zarodka. Po drugie, zarodki ludzkie dość często są tzw. mozaiką, czyli budujące je komórki mogą mieć różny skład chromosomowy: część z nich może być diploidalna, zupełnie normalna i zdrowa, a część – aneuploidalna, tzn. posiadać za dużo lub za mało chromosomów. W związku z tym analiza pojedynczej komórki, zwłaszcza jeśli chcemy sprawdzić, czy zarodek jest poprawny pod względem składu chromosomowego, nie daje w pełni wiarygodnych wyników. W związku z tym obecnie znacznie częściej pobiera się do analizy genetycznej kilka komórek z zewnętrznej warstwy blastocysty, tzw. trofektodermi.

Pobrany materiał można następnie zanalizować bądź to pod kątem konkretnych mutacji, jeżeli z wywiadu genetycznego wiadomo, że rodzice są ich nosicielami, bądź pod kątem aberracji chromosomowych, np. aneuploidii czy translokacji chromosomowych.

**Takiego rodzaju badania robi się też przy poczęciu naturalnym, ze względu na wiek matki.**

DR HAB. ANNA AJDUK

Tak, lecz wówczas przeprowadzane są na późniejszym etapie ciąży i oczywiście materiał do analizy uzyskiwany jest w inny sposób.

#### **Rodzice mogą się nie zgodzić na takie badania?**

Skorzystanie z diagnostyki przedimplantacyjnej to zawsze ich decyzja. Poza tym te badania są dodatkowo płatne i przeprowadza się je tylko w razie potrzeby.

#### **Chociaż in vitro może kojarzyć się niektórym ludziom z tajemniczymi manipulacjami w laboratorium, z naszej rozmowy wynika, że to dobrze opracowana i dość prosta procedura i problem w tym, żeby zarodek chciał się rozwijać.**

Każda procedura medyczna musi być świetnie wystandaryzowana i sprawdzona pod względem bezpieczeństwa, inaczej nie weszłaby do użytku. W przypadku zapłodnienia in vitro nie jest inaczej, z tym że musimy pamiętać, że pierwsze dziecko poczęte tą techniką urodziło się w 1978 r., więc, jak już wspominałam wcześniej, na dokładne analizy długofalowego wpływu tej metody na zdrowie dzieci trzeba jeszcze poczekać.

Obecnie dostępne dane wskazują, że dzieci poczęte poprzez zapłodnienie in vitro nie różnią się znacząco pod względem zdrowia od ogółu populacji. Co nie zmienia faktu, że naukowcy cały czas prowadzą badania mające na celu z jednej strony dokładne sprawdzenie wpływu poszczególnych procedur na różne aspekty funkcjonowania organizmu, a z drugiej optymalizację tych procedur, tak by uczynić je jeszcze bezpieczniejszymi. Ostatnio pojawiły się na przykład doniesienia, że procedury towarzyszące sztucznemu zapłodnieniu, takie jak np. hodowla zarodków in vitro czy wspomniane już pobieranie poszczególnych blastomerów w celu diagnostyki przedimplantacyjnej, należą do grupy czynników środowiskowych, które mogą powodować w komórkach zarodka zmiany epigenetyczne. Zmiany epigenetyczne są to odwracalne modyfikacje chemiczne materiału genetycznego w komórce, niezmiennające jego sekwencji, ale wpływające np. na poziom ekspresji pewnych genów. Takie zmiany może też wywoływać np. nasz sposób odżywiania się, styl życia czy zanieczyszczenie środowiska. Zapłodnienie in vitro byłoby więc tylko jedną z wielu zmiennych środowiskowych, która odbija się na epigenomie poczętych w ten sposób ludzi i na razie trudno powiedzieć, czy związane z nim modyfikacje mają znaczenie dla organizmu na późniejszych etapach rozwoju.

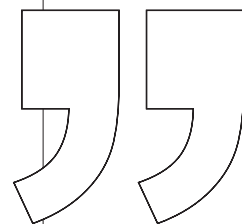
#### **Jednym z głównych zastrzeżeń przeciwników in vitro jest mrożenie zarodków, utożsamiane z mrożeniem dzieci.**

Cóż, tu chyba wszystko zależy od tego, czy kilkudniowy zarodek, taką blastocystę na przykład, uznajemy już za dziecko, czy jeszcze nie. Ale to jest już temat do

zupełnie innej rozmowy. Warto może tylko zdać sobie sprawę, że w technice zapłodnienia in vitro naprawdę nie powstaje tak dużo nadprogramowych zarodków. Zwykle tylko część z zapłodnionych oocytów osiąga pożądane stadium rozwojowe i nadaje się czy to do przeniesienia do macicy pacjentki, czy do zamrożenia. Te zamrożone są zazwyczaj wykorzystywane przez pacjentkę w dalszych etapach leczenia, gdy pierwszy transfer nie zakończy się ciążą.

Nie zmienia to oczywiście faktu, że zamrożonych zarodków przybywa. W wielu krajach pacjentka, jeśli nie chce ich już sama wykorzystać, może donować je bądź do celów reprodukcyjnych, czyli przekazać innym niepełnym parom, bądź naukowych. W Polsce prowadzenie badań na zarodkach ludzkich jest zabronione. Trzeba jednak podkreślić, że takie badania, dozwolone i prowadzone w innych krajach, są niezwykle ważne dla poznania mechanizmów regulujących ludzki rozwój zarodkowy. Oczywiście istnieją modele zwierzęce, które wspomagają nas w zgłębianiu tajników rozwoju zarodkowego ssaków, ale myślę to nie

Dzieci poczęte poprzez zapłodnienie in vitro nie różnią się znacząco pod względem zdrowia od ogółu populacji.



człowiek. Procesy zachodzące w takich modelowych zwierzęcych zarodkach nie zawsze dobrze odzwierciedlają to, co się dzieje w zarodku ludzkim.

#### **Celem tych badań są nowe techniki leczenia bezpłodności?**

Między innymi. Badania podstawowe, czyli mające na celu po prostu poznanie sposobu, w jaki funkcjonuje komórka czy organizm – a w naszym przypadku zarodek – są kluczowe dla prac aplikacyjnych, związanych z poszukiwaniem nowych lub optymalizacją istniejących terapii. Bez nauk podstawowych trudno jest rozwijać medycynę.

#### **Czy to nadzieja dla kobiet, którym obecnie medycyna nie może pomóc? Jakie nowe techniki rysują się na horyzoncie?**

Moim zdaniem w najbliższym czasie zapłodnienie in vitro pozostanie główną techniką leczenia niepłodności i tu możemy jedynie mówić o optymalizacji tej procedury. Ale istnieją oczywiście badania wykraczające poza ten horyzont. Jednym z kierunków takich badań jest tworzenie tzw. sztucznych gamet

z komórek macierzystych. Mogą to być komórki macierzyste zarodkowe, jak i pochodzące z dorosłego organizmu, a także tzw. indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, czyli zwykłe komórki, które za pomocą technik biologii molekularnej zostały przekształcone w komórki macierzyste. Na razie takie badania prowadzi się głównie na zwierzętach, choć są też już doniesienia o wytworzeniu ludzkich plemników z zarodkowych oraz indukowanych komórek macierzystych. Wydajność tego typu eksperymentów jest jeszcze bardzo niska. Gamety, które udało się stworzyć, są coraz bardziej podobne do prawdziwych komórek rozrodczych, ale ciągle nieidealne. Niemniej w przypadku doświadczeń na zwierzętach udało się z nich wytworzyć zarodki, które następnie prawidłowo się rozwinęły i urodziły się z nich młode. Wyniki są więc obiecujące.

Inna gałąź badań poświęcona jest możliwości rozwoju zarodka poza organizmem kobiety. Obecnie rutynowo hodujemy in vitro zarodki w okresie przed

rozwój 105-120-dniowego płodu owcy (odpowiednik 22-24-tygodniowego ludzkiego płodu) przez 4 tygodnie. Jest to rodzaj plastikowego pojemnika wypełnionego specjalnym płynem naśladującym płyn owodniowy, wyposażonego w aparaturę zapewniającą ciągły przepływ płynu i odpowiednie natlenienie krwi płodu. Tego typu badania prowadzi się, by zwiększyć szanse na przeżycie najmniejszych wcześniaków, ale w przyszłości mogą one doprowadzić do opracowania technologii umożliwiającej rozwój płodu całkowicie poza organizmem matki.

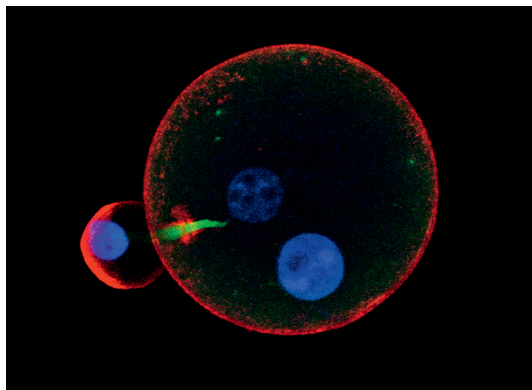
### Przyczyną niepowodzeń w zajściu w ciążę nie musi być problem z komórkami rozrodczymi.

Tak. Jeśli występują trudności w połączeniu komórek, to – jak wynika z tej rozmowy – dla współczesnej medycyny stosunkowo mały problem. Jeżeli jednak źle przebiega proces implantacji albo dalsze etapy rozwoju zarodkowego, to tu nasza wiedza jest niestety ograniczona. Implantacja nie jest zbadana tak dokładnie jak zapłodnienie czy przedimplantacyjny rozwój zarodkowy, ponieważ takie badania trudno jest prowadzić w warunkach in vitro.

### Problem bezpłodności dotyka coraz większej liczby par. Czy można się spodziewać, że w tym kierunku prowadzonych będzie coraz więcej badań?

Mam nadzieję, że tak. Z roku na rok wzrasta liczba naukowców zajmujących się biologią i medycyną reprodukcyjną, coraz więcej jest czasopism i artykułów poświęconych tej tematyce. Wciąż jednak brakuje źródeł finansowania nakierowanych konkretnie na takie badania, choć na świecie istnieją liczne prywatne fundacje wspierające badania nad chorobami naczyniowymi, neurodegeneracyjnymi czy nowotworzeniem. Ostatnio na jednej z konferencji zastanawialiśmy się, z czego może to wynikać i doszliśmy do wniosku, że niepłodność jest nadal tematem tabu. Dzięki licznym kampaniom społecznym dużo łatwiej jest się przyznać, nawet tym pięknym, znanym i bogatym, że oni sami czy członkowie ich rodzin cierpią na chorobę Parkinsona, Alzheimerera czy nowotwór, i w konsekwencji przekazać fundusze na finansowanie badań nad taką chorobą. Do niepłodności i korzystania z zapłodnienia in vitro nikt nie chce się przyznać i w związku z tym, nie ma też chętnych do dotowania takich badań. Co więcej, często pojawiają się głosy, że nie ma sensu leczyć niepłodności, gdyż Ziemia i tak jest przeludniona. Że lepiej zachęcać do adopcji. Ja jednak jestem zdania, że niemożność posiadania własnego potomka jest dla wielu par prawdziwym dramatem i że ci ludzie zasługują na pomoc.

Z DR HAB. ANNA AJDUK  
 ROZMAWIAŁA AGNIESZKA KLOCH  
 ZDJĘCIE JAKUB OSTAŁOWSKI



implantacją, czyli od zapłodnienia do osiągnięcia stadium blastocysty. Potrafimy też, choć jeszcze niezbyt efektywnie, wydłużyć hodowlę o dalsze kilka dni, czyli poza moment, w którym zarodek normalnie ulega implantacji. Podobnie, jak w przypadku sztucznych gamet, i tu badania prowadzi się głównie na zwierzętach (myszach), choć opublikowano także prace, w których takiej wydłużonej, 13-dniowej hodowli poddano zarodki ludzkie (implantacja ludzkiego zarodka zachodzi ok. piątego dnia rozwoju). Co bardzo ważne, procesy morfogenetyczne, którym podlegały one w czasie hodowli in vitro, przypominały te, które zachodzą w tym czasie w warunkach in vivo.

Prace nad pozaustrojowym rozwojem zarodka prowadzi się też na drugim końcu tego procesu. Od lat 60. ubiegłego wieku trwają prace nad opracowaniem sztucznego łożyska, które podtrzymywałoby rozwój bardziej zaawansowanego płodu poza macicą – jak na razie bez poważniejszych sukcesów. W ostatnich latach udało się jednak opracować rodzaj sztucznej macicy, która jest w stanie podtrzymać

Zdjęcie z mikroskopu:  
 contr 3 – zygota myszy,  
 w centrum komórki widać  
 dwa jądra zygotyczne  
 (tzw. przedjądra)  
 zawierające materiał  
 genetyczny pochodzący  
 od plemnika i od oocyty.  
 Po lewej stronie widoczne  
 drugie ciało kierunkowe  
 – siostrzana komórka oocyty  
 powstała na skutek drugiego  
 podziału mejotycznego.  
 DNA wybarwione na kolor  
 niebieski, mikrotubule  
 budujące pozostałości  
 po wrzecionie podziałowym  
 na kolor zielony, a filenty  
 aktynowe w warstwie  
 korowej zygoty  
 – na czerwono.