

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 20951 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **200100177**

(51) MPK: **A01N 1/00**

(22) Datum prijave: **03.07.2001**

(45) Datum objave: **28.02.2003**

(72) Izumitelji: **VIRANT-KLUN Irma, 1000 LJUBLJANA, SI;**
MIVŠEK Jožica, 1231 LJUBLJANA-ČRNUČE, SI;
BAČER-KERMAVNER Lili, 1000 LJUBLJANA, SI;
TOMAŽEVIČ Tomaž, 1000 LJUBLJANA, SI

(73) Imetnik: **GINEKOLOŠKA KLINIKA V LJUBLJANI, KLINIČNI CENTER,**
ŠLAJMERJEVA 3, 1000 LJUBLJANA, SI

(74) Zastopnik: **Marjan Pipan, ing. el., Kotnikova 5, 1000 Ljubljana, SI**

(54) **METODA ZA ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE HUMANIH BLASTOCIST**

(57) Predmet izuma je metoda za zamrzovanje in odmrzovanje humanih blastocist, ki omogoča kasnejšo uporabo blastocist pri postopkih zunajtelesne oploditve. Metoda po izumu predstavlja izboljšano dvostopenjsko metodo, pri čemer se razlikuje od

znanih po temperaturi, na kateri poteka zamrzovanje zarodkov, sestavi zamrzovalnih in odmrzovalnih raztopin izbiri gojišč, programu ohlajanja blastocist in spiranju blastocist v odmrzovalnih raztopinah.

SI 20951 A

Ginekološka klinika v Ljubljani, Klinični center

Ljubljana

5

METODA ZA ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE HUMANIH BLASTOCIST

10

Predmet izuma je metoda za zamrzovanje in odmrzovanje humanih blastocist, ki omogoča kasnejšo uporabo blastocist pri postopkih zunajtelesne oploditve. Izum sodi v razred A 01N 1/00 mednarodne patentne klasifikacije.

15

Blastocista pri človeku je razvojna stopnja zarodka pred ugnezditvijo, na kateri že pride do diferenciacije celic. V blastocisti opazimo votlinico - blastocel, ki jo na eni strani obdaja masa celic - embrioblast (po ugnezditvi v maternici se razvija kot zarodek) in na drugi strani tanek sloj celic - trofoblast (po ugnezditvi v maternici se razvija kot posteljica). Blastocista ima skupno preko 30 celic. V naravnih pogojih zarodek dospe v maternico kot blastocista in se ugnezdi.

20

V pogojih in vitro oziroma v postopku zunaj telesne oploditve s prenosom zarodka (IVF-ET) humane zarodke v laboratoriju razvijemo do

razvojnega stadija blastociste v posebnih gojiščih. V preteklosti je bilo možno vzgojiti blastociste samo v prisotnosti celičnih kokultur (Vero celice, ampularne celice, endometrijske celice...), danes pa so dostopna posebna gojišča s kompleksno sestavo, v kateri se zarodki razvijejo do blastociste.

- 5 Zarodki dosežejo razvojno stopnjo blastociste po 5 do 6 dneh gojenja v pogojih in vitro. Zarodke gojimo v inkubatorju na 37°C, v temi, pri 5 % CO₂.

Blastociste gojimo tako po klasičnem postopku zunajtelesne oploditve z mikro-inseminacijo jajčnih celic v epruvetki s pripravljenim semenom partnerja (ženski vzroki neplodnosti kot so obolenja jajcevodov, endometrioza, endokrinološke nepravilnosti, nepravilnosti maternice) ali po neposrednem vnosu semenčice v citoplazmo jajčne celice (moški vzroki neplodnosti - slaba kakovost semena ali semenčice iz mod ali nadmodka, če semenčic ni v semenu), ko pod posebnim, inverznim
10 mikroskopom s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja v vsako jajčno celico mikro-injiciramo po eno semenčico.

Zarodke, ki se razvijejo po oploditvi jajčnih celic, je možno razviti do razvojne stopnje blastociste v gojiščih različnih proizvajalcev. Na Ginekološki kliniki v Ljubljani se že več let ukvarjamo z gojenjem zarodkov
20 do razvojne stopnje blastociste. Sedaj zarodke gojimo v gojiščih, imenovanih Blast Assist System (gojišče M1 in gojišče M2) proizvajalca Medi-Cult, Danska. Zarodke vsake ženske prenesemo najprej v gojišče M1 (na 1 in 2 dan gojenja), nato pa vsak dan v sveže gojišče M2 (na 3.,

4., 5. dan gojenja). Na dan 5 se približno 60% vseh zarodkov razvije do razvojne stopnje blastociste. Največ dva zarodka vnesemo v maternico, preostale zarodke pa zamrzujemo.

5 V preteklosti smo gojili zarodke samo 2 dni do razvojne stopnje 2-5-celičnikov. Gojenje zarodkov do razvojne stopnje blastociste pa ima več prednosti:

- na ta način vemo več o biološki kakovosti zarodkov, saj se zarodki z večjimi genetskimi ali metabolnimi nepravilnostmi ne razvijejo do razvojne stopnje blastociste. Na ta način lažje izberemo zarodke, primerne za prenos v maternico;
 - razvojna stopnja blastociste je bližja naravnim pogojem, saj zarodki dospejo v maternico na razvojni stopnji blastociste;
 - ugnezditvena sposobnost blastociste je večja kot pri manjceličnem zarodku, kar omogoča boljše klinične rezultate (več nosečnosti).
- 15 Omogoča, da v maternico vnesemo manj zarodkov, ne da bi se poslabšal klinični rezultat. Razmišljamo že o prenosu enega samega zarodka v maternico.

Po vnosu blastocist v maternico na prvi poskus zunajtelesne oploditve zanosijo več kot 40% žensk, ki prejmejo zarodke (primerjava: 25% žensk, pri katerih vnesemo manjcelične zarodke).

Ker v postopku zunajtelesne oploditve hormonsko spodbujamo jajčnike, da pridobimo čim več jajčnih celic (povprečno 6), pogosto pri paru

pridobimo več kot 2 zarodka in je nadštevilne zarodke potrebno zamrzniti. Prav tako je potrebno zarodke zamrzniti, kadar so dani klinični vzroki (nevarnost sindroma hiperstimulacije jajčnikov, bolezen - npr. viroza), da zarodke z zamrzovanjem shranimo in prenos v maternico odložimo na kasnejši čas. Zarodke zamrznemo po predhodnem pisnem soglasju para (ženske in moškega). Če ženska ne zanosi s svežimi zarodki, pride po zamrznjene zarodke. Zarodke na dan prenosa v maternico odmrznemo in prenesemo v maternico.

Zamrzovanje manjceličnih humanih zarodkov je že ustaljena klinična praksa, saj so bili manjcelični zarodki uspešno zamrznjeni, odmrznjeni in prenešeni v maternico (nosečnost) že leta 1983. Referenca: Trounson AO, Mohr, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983; 53, 1087-1090.

Bistvo zamrzovanja zarodkov je v tem, da zarodke pripravimo v posebnih zamrzovalnih raztopinah s krioprotektantom in saharozo. Te raztopine počrpajo vodo iz zarodkov in jo nadomestijo s krioprotektantom, kar preprečuje kristalizacijo vode med ohlajanjem zarodkov. Nato zarodke prenesemo v plastične paličice in postopno programsko ohladimo v posebnem aparatu v parah tekočega dušika do -150°C . Nato jih prenesemo v kontejner s tekočim dušikom (-196°C) in shranimo.

Veliko manj uspešno pa je zamrzovanje in odmrzovanje blastocist, saj je to zamrzovanje v večini centrov za zdravljenje neplodnosti še

neuspešno. Do sedaj je bila najuspešnejša dvostopenjska metoda za zamrzovanje in odmrzovanje blastocist, ki jo je razvil Menezo. Referenca: Menezo Y, Guerin, JF, Czyba, JC. Improvement of human early development in vitro by coculture on monolayers of Vero Cells. Biol
 5 Reprod 1990; 42: 301.

Pri omenjeni dvostopenjski metodi, ki poteka na sobni temperaturi, je za osnovo uporabljeno gojišče B2, ki mu je nujno potrebno dodati še 10% serum, nakar zarodke ohladimo do - 37°C. Pri odmrzovanju se zarodke 10 minut spira v svežem gojišču.

10 Metoda za zamrzovanje in odmrzovanje humanih blastocist po izumu se od opisane znane dvostopenjske metode loči predvsem v naslednjih komponentah:

- temperaturi, na kateri poteka zamrzovanje zarodkov, sestavi zamrzovalnih in odmrzovalnih raztopin (metoda po izumu: na 37°C -
 15 v inkubatorju - ker so poskusi na živalskih zarodkih pokazali, da je krioprotektant glicerol za zarodke na toplem manj toksičen);
- izbiri gojišča (metoda po izumu: gojišče B2 – Menezo - smo nadomestili z univerzalnim IVF gojiščem (Medi-Cult, Danska). Raztopinam ne dodajamo seruma. Dokazali smo, da je lahko
 20 zamrzovanje in odmrzovanje humanih zarodkov zelo uspešno tudi brez dodatka seruma. V svetu je splošno sprejeto mnenje, da serum predvsem pri odmrzovanju zarodkov veliko doprinese k revitalizaciji zarodkov, mi pa smo mnenja, da kot biološki dodatek predstavlja

neznanko in lahko s svojimi nepravilnimi biološkimi sestavinami deluje tudi negativno;

- programu ohlajanja zarodkov v aparatu - pare tekočega dušika – (metoda po izumu: zarodke ohladimo do -150°C , tako je prenos zarodkov v tekoči dušik do -196°C manj travmatičen, zaradi manjše temperaturne razlike;
- spiranju zarodkov po odmrzovalnih raztopinah (metoda po izumu: zarodke samo na hitro speremo v svežem gojišču s tem, da jih približno 5-krat aspiriramo v in iz steklene pipete, nakar jih inkubiramo v svežem gojišču v inkubatorju).

Univerzalno IVF gojišče za gojenje jajčnih celic in zarodkov, ki ga uporabljamo ima naslednjo sestavo:

- Earl's Balanced Salt (EBSS) raztopina kot osnova
 - kalcijev klorid 264,90 mg/l
 - kalijev klorid 400,00 mg/l
 - magnezijev sulfat 200,00 mg/l
 - natrijev klorid 6800,00 mg/l
 - natrijev hidrogen karbonat 2200,00 mg/l
 - natrijev dihidrogen karbonat 158,30 mg/l
 - D-glukoza 1000 mg/l
 - fenol rdeče 10,00 mg/l
- z dodatki
 - natrijev piruvat

- nadomestek seruma (SSR) oz. sintetični serum
- natrijev bikarbonat
- človeški serumski albumin
- penicilin 50,00 IU / l (poseben produkt 1095)
- 5 - streptomycin 50 mg/l (poseben produkt 1095)
- fenol rdeče (poseben produkt 1030)
-

Opis postopka zamrzovanja po metodi po izumu:

Zamrzovanje blastocist poteka po predhodnem pisnem soglasju para

10 (ženske in moškega) tako, da zamrzovalne raztopine pripravimo in inkubiramo v inkubatorju vsaj eno uro pred uporabo. Nato sledi prenos zarodkov v zamrzovalno raztopino 1 (Univerzalno IVF gojišče (Medi-Cult, Danska) + 5 % glicerol (prefiltriran) za 10 minut na temperaturi 37°C (v inkubatorju). Nato prenesemo zarodke v zamrzovalno raztopino 2

15 (Univerzalno IVF gojišče (Medi-Cult, Danska) + 10 % glicerol (prefiltriran) + 0,2 M saharoza) za 10 minut na temperaturi 37°C (v inkubatorju). Nadalje prenesemo zarodke v plastično paličico s pokrovčkom (ime, priimek, letnica rojstva ženske), ki jo vložimo v zamrzovalni aparat (MiniCool 40, Air Liquide, Francija) kjer pričnemo ohlajati zarodke.

20 Sledi program ohlajanja po naslednjem razporedu:

- od temperature 22°C do -6°C po 2°C / minuto;

- pri - 6°C : "seeding" (potopitev kovinske paličice v tekoči dušik pri -196°C in nekajsekundni dotik predela slamice v katerem so zarodki v napravi za ohlajevanje zarodkov);
- od temperature -6°C do -40°C po 0,3°C / minuto;
- 5 - od temperature -40°C do -150°C po 35°C / minuto.

Po končanem ohlajanju paličico z zamrznjenimi zarodki prenesemo v posodo s tekočim dušikom, od tam pa v kontejner s tekočim dušikom, kjer so shranjeni na temperaturi -196°C.

10 Opis postopka odmrzovanja po metodi po izumu:

Zamrzovalne raztopine pripravimo in inkubiramo v inkubatorju vsaj 1 uro pred uporabo.

Paličico z zarodki vzamemo iz kontejnerja in jo ogrevamo nekaj sekund na sobni temperaturi. Nato zarodke sprostimo iz slamice v petrijevko.

- 15 Sledi prenos zarodkov v odmrzovalno raztopino 1 (Univerzalno IVF gojišče (Medi-Cult, Danska) + 0,5 M saharoza za 10 minut pri sobni temperaturi (gaziranje s CO₂), nakar prenesemo zarodke v odmrzovalno raztopino 2 (Univerzalno IVF gojišče (Medi-Cult, Danska) + 0,2 M saharoza) za 10 minut pri sobni temperaturi (gaziranje s CO₂).

- 20 Zarodke nato speremo v svežem gojišču in jih približno 1 uro inkubiramo v svežem gojišču (Univerzalno IVF gojišče (Medi-Cult, Danska) na 37°C in 5 % CO₂).

Pri pregledu zarodkov ugotavljamo preživelost zarodka. Zarodek je preživel zamrzovanje in odmrzovanje, če je več kot 50% blastomer nepoškodovanih. Največ tri preživele odmrznjene zarodke prenesemo v maternico.

- 5 Odmrznjene blastociste vnesemo v maternico v naravnem ciklusu, če je to mogoče (normalna ovulacija). Zelo pomembna je koordinacija med maternico in razvojnim stadijem zarodka. Zarodke prenesemo v maternico na 4. dan, to je 6 dni po injekciji HCG. V primerih nenormalne ovulacije je potrebna blažja priprava maternice z Metrodin-HP.

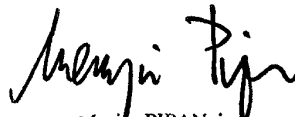
10

Za:

Ginekološka klinika v Ljubljani, Klinični center

Ljubljana

15



Marjan PIPAN, ing.
pacientni zastopnik

20

PATENTNI ZAHTEVKI

1. Metoda za zamrzovanje humanih blastocist,

označena s tem,

- 5 da pustimo blastociste v zamrzovalni raztopini 1 za 10 minut na temperaturi 37°C, nato v zamrzovalni raztopini 2 za 10 minut na temperaturi 37°C in jih nato prenesemo v plastično paličico s pokrovčkom ter ohladimo po programu ohlajevanja od temperature 22°C do -150°C in jih shranimo na temperaturi -196°C.

10

2. Metoda za zamrzovanje humanih blastocist, po zahtevku 1,

označena s tem,

da je zamrzovalna raztopina 1 univerzalno IVF gojišče + 5 % glicerol (prefiltriran).

15

3. Metoda za zamrzovanje humanih blastocist, po zahtevku 1,

označena s tem,

da je zamrzovalna raztopina 2 univerzalno IVF gojišče + 10 % glicerol (prefiltriran) + 0,2 M saharoza .

20

4. Metoda za zamrzovanje humanih blastocist, po zahtevku 1,

označena s tem,

da poteka ohlajevanje od temperature 22°C do -6°C po 2°C / minuto,
od temperature -6°C do -40°C po 0,3°C / minuto in od temperature -
40°C do -150°C po 35°C / minuto.

- 5 5. Metoda za zamrzovanje humanih blastocist, po zahtevku 1,

označena s tem,

da pri -6°C izvedemo potopitev kovinske paličice v tekoči dušik pri -
196°C in se za nekaj sekund dotaknemo predela slamice v katerem so
zarodki v napravi za ohlajevanje zarodkov.

10

6. Metoda za odmrzovanje humanih blastocist,

označena s tem,

da paličico z zamrznjenimi blastocistami ogrevamo nekaj sekund na
sobni temperaturi, nakar jih prenesemo v odmrzovalno raztopino 1 za
15 10 minut pri sobni temperaturi (gaziranje s CO₂) in nato v odmrzovalno
raztopino 2 za 10 minut pri sobni temperaturi (gaziranje s CO₂);
blastociste nato hitro speremo v svežem gojišču in jih približno 1 uro
inkubiramo v svežem gojišču.

- 20 7. Metoda za odmrzovanje humanih blastocist, po zahtevku 6,

označena s tem,

da je odmrzovalna raztopina 1 univerzalno IVF gojišče + 0,5 M
saharoze.

8. Metoda za odmrzovanje humanih blastocist, po zahtevku 6,

označena s tem,

da je odmrzovalna raztopina 2 univerzalno IVF gojišče + 0,2 M saharoze.

5

9. Metoda za odmrzovanje humanih blastocist, po zahtevku 6,

označena s tem,

da je sveže gojišče univerzalno IVF gojišče pri 37°C in 5 % CO₂.

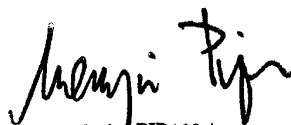
10

Za:

Ginekološka klinika v Ljubljani, Klinični center

15

Ljubljana



Marjan PIPAN, ing.
patentni zastopnik

20