



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

257098

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 02 F 1/58

(22) Přihlášeno 10 10 86

(21) PV 7301-86.Z

(40) Zveřejněno 17 09 87

(45) Vydáno 16 01 89

(75)

Autor vynálezu

TRÁVNÍK PAVEL doc. MUDr. DrSc., BRNO

(54) Způsob přípravy vody pro kultivaci embryí, buněk a tkání

Předmětem řešení je příprava vody pro média určená ke kultivaci buněk, tkání a embryí. Postup spočívá v tom, že se na surovou vodu s obsahem anorganických a organických nečistot působí oxidačním činidlem, například manganistanem draselným a koncentrovanou kyselinou sírovou nebo ozonem a činidlem vytvářejícím sraženinu se sloučeninami obsahujícími těžké kovy, například uhličitany, sírany nebo fosforečnany alkalických kovů, vzniklé sraženiny se odstraní například sedimentací a poté se takto upravená voda podrobí nejméně jedné destilaci. Takto upravenou vodu lze využít v základním výzkumu, v humanitní a veterinární medicíně, v zemědělství pro účely diagnostiky, léčby neplodnosti a v biologii reprodukce hospodářských zvířat.

Vynález řeší přípravu vody pro média určená ke kultivaci buněk, tkání a embryí tak, aby neobsahovala látky nepříznivě ovlivňující výsledek kultivace, zejména sloučeniny těžkých kovů a některé organické látky.

Běžná redestilovaná a/nebo deionizovaná voda nevyhovuje požadavkům za přípravu růstových médií pro kultivaci buněk, tkání a zejména oocytů a časných embryí. Růst buněk v kultivačních médiích připravených z takové vody vede k nestandardnosti nebo nedochází vůbec k buněčnému dělení. Dosud používané metody čištění vody pro kultivaci jsou založeny především na opakované destilaci nebo na kombinaci destilace s deionizací pomocí iontoměníčů.

Hlavní nevýhodou dosud používaných metod je energetická náročnost v důsledku až pětinašobné destilace a dále nedokonalé odstranění škodlivých látek, které při destilaci zčásti přecházejí do destilátu a nejsou všechny zachycovány ani iontoměníči. Tento problém je většinou řešen výběrem zdroje výchozí vody a vede k nestandardnosti a vysokým nákladům na čištění vody pro kultivaci.

Nedostatky dosud známých postupů přípravy vody pro kultivaci odstraňuje postup podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že se na surovou vodu s obsahem anorganických a organických nečistot působí oxidačním činidlem, například manganistanem draselným a koncentrovanou kyselinou sírovou nebo ozonem a činidlem vytvářejícím sraženinu se sloučeninami obsahujícími těžké kovy, například uhličitany, sírany, nebo fosforečnany alkalických kovů, vzniklé sraženiny se odstraní například sedimentací a poté se takto upravená voda podrobí nejméně jedné destilaci.

Postup podle vynálezu zabezpečuje odstranění všech látek, které ohrožují úspěch kultivace, při vynaložení minimálních energetických a materiálních nákladů. S vodou čištěnou postupem podle vynálezu bylo dosaženo zcela standardních výsledků kultivace a to jak myších vajíček ve vlastní modifikaci média, tak i při oplození lidských vajíček a jejich další kultivaci postupem podle publikace Pilka L. a spol.: Porod po nitroděložním přenosu embryí získaných fertilizací a kultivací oocytů in vitro (Čs. gynekol. 50, 452-459, 1985). Po transferu embryí vypěstovaných v médiu připraveném z vody čištěné podle vynálezu došlo v r. 1986 dosud k 7 otěhotněním u neplodných žen.

Příprava pro kultivační média je blíže vysvětlena v následujících příkladech.

P ř í k l a d 1

K pitné vodě bylo přidáno 0,05 % manganistanu draselného a 0,05 % koncentrované kyseliny sírové. Voda byla 30 min povařena a bylo k ní zahorka přidáno 0,1 % bezvodého uhličitanu sodného a 0,05 % terciárního fosforečnanu sodného. Po pozvolném zchladnutí byla odstraněna svařenina obsahující anorganické nečistoty a produkty redukce manganistanu sedimentací v dekantaci a voda byla dvakrát destilována při atmosférickém tlaku ve skleněné aparatuře.

P ř í k l a d 2

K pitné vodě bylo přidáno 0,05 % bezvodého síranu sodného, 0,05 % bezvodého uhličitanu sodného a 0,05 terciárního fosforečnanu sodného. Poté byl po dobu 10 min zaváděn vzduch obohacený ozónem z ozonizátoru. Voda byla povařena a po zchladnutí byla odstraněna sraženina obsahující anorganické nečistoty sedimentací a dekantací a následovaly dvě destilace při atmosférickém tlaku ve skleněné aparatuře.

Kvalita vody připravené podle vynálezu byla srovnána s kvalitou vody předčištěné katexem a 4x destilované. Při kultivaci časných myších embryí ve vlastní modifikaci kultivačního média (Šťastná a Trávník) Submicroscopic structure of the mouse morulae and blastocysts developed in vitro from two-cell embryos. Folia Morph. (Prague) 22, 86-95, 1984) s použitím vody podle vynálezu bylo 100 % kultivací úspěšných (vývoj od buněčného stádia do stádia moruly až blastocysty).

Ve srovnávacím souboru bylo použito stejného média, avšak připraveného z vody předčištěné katexem a 4x destilované. Za jinak stejných podmínek bylo v tomto období 60 % kultur úspěšných (vývoj od 2-buněčného stádia do stádia moruly až blastocysty), 20 % částečně úspěšných (vývoj od 2-buněčného stádia do 4- až 8-buněčného stádia nebo vývoj části embryí od 2-buněčného stádia do stádia moruly až blastocysty) a 20 % neúspěšných (embrya se nevyvíjela). Z toho lze uzavřít, že bylo dosaženo naprosté standardnosti kvality vody pro kultivaci.

Vodu pro kultivaci podle vynálezu lze použít pro přípravu růstových médií pro pěstování buněk, tkání a embryí a pro oplození vajíček v základním výzkumu, v humánní a veterinární medicíně a v zemědělství pro účely diagnostiky, léčby neplodnosti a v biologii reprodukce hospodářských zvířat. Lze ji dlouhodobě uchovávat v chladničce nebo po sterilizaci i za normální teploty.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy vody pro kultivaci embryí, buněk a tkání, vyznačující se tím, že na surovou vodu s obsahem anorganických a organických nečistot se působí oxidačním činidlem, například manganistanem draselným a koncentrovanou kyselinou sírovou nebo ozonem a činidlem vytvářejícím sraženinu se sloučeninami obsahujícími těžké kovy, například uhličitany, sírany nebo fosforečnany alkalických kovů, vzniklé sraženiny se odstraní například sedimentací a poté se takto upravená voda podrobí nejméně jedné destilaci.