

© Borgis

# Transfer zarodków w świetle najnowszych badań

**\*Cezary Grygoruk, Grzegorz Mrugacz, Mirosław Grusza, Karol Ratomski,  
Beata Stasiewicz-Jarocka, Piotr Pietrewicz**

Centrum Położniczo-Ginekologiczne „Bocian” w Białymstoku  
Kierownik Centrum: dr n. med. Grzegorz Mrugacz

---

## EMBRYO TRANSFER – LATEST STUDIES

---

### Summary

---

The method of embryo transfer hasn't changed much since the beginning of the assisted reproduction technology. The embryo transfer is usually performed with the use of the insulin syringe connected tightly to the catheter. However, it is very easy to achieve high pressure in the transferred volume during embryo transfer. The diameter of the syringe is up to 10 times higher than that of the catheter. This means that the movement of the plunger during the ejection steps, causes an important increase of the speed of the transferred fluid which is related with both the pressure applied on the plunger and the difference between the internal diameters of the syringe and of the catheter. In some conditions the catheter connected to the syringe determines a speed of the transferred fluid very high up to several meters per second. Furthermore, it is very easy to achieve a high pressure, up to 155 mmHg, in the transferred volume with the use of the standard syringe-catheter complex. Moreover, the pressure build up in the transferred liquid is proportional to the ejection speed of the transferred load. The fast ejection of the transferred load can induce morphological changes, trigger apoptotic processes and delay embryo development. Therefore, it is reasonable to suggest transferring the embryos at the lowest possible ejection speed.

---

Key words: catheter, embryo transfer, infertility, pressure

---

Transfer zarodków (ET) jest jednym z kluczowych elementów procesu leczenia niepłodności metodami zapłodnienia pozaustrojowego. Jego głównym celem jest bezpieczne umieszczenie zarodków o jak najwyższym potencjale rozwojowym w jamie macicy. Pomimo upływu kilkudziesięciu lat od kiedy zaczęto stosować techniki zapłodnienia pozaustrojowego, sposób wykonania ET nie uległ zasadniczym zmianom. ET przeprowadza się przy pomocy specjalnych sond, kateterów, połączonych szczelnie ze strzykawką „insulinówką”. W celu pobrania zarodków do katetera, zanurza się dystalny koniec tego urządzenia w podłożu hodowlanym zawierającym zarodki. Następnie odciąga się tłok strzykawki, wskutek czego do katetera wchodzi podłoże wraz z zarodkami przeznaczonymi do transferu. Przygotowany w taki sposób kateter wprowadza się do jamy macicy przez kanał szyjki macicy. Następnie w wyniku naciśnięcia tłoka strzykawki zostaje wytworzone ciśnienie w komorze roboczej, które jest przenoszone do wnętrza katetera, na skutek czego dochodzi do wstrzyknięcia transferowanego podłoża hodowlanego wraz z zarodkami do jamy macicy.

Dysproporcja pomiędzy średnicą tłoka strzykawki i światła katetera sprzyja szybkiemu przepływowi płynu przez kateter i co za tym idzie gwałtownym fluktuacjom ciśnienia. W badaniach własnych wykazano, że przy pomocy zestawu do transferu zarodków złożonego z kateteru podłączonego do strzykawki insulinowej można uzyskać stosunkowo wysokie wartości ciśnienia w transferowanym płynie, dochodzące nawet do 155 mmHg. Obserwowane zmiany ciśnienia charakteryzowały się krótkim czasem trwania, do 0,04 sekundy. Z tego też powodu rejestrowane tempo wzrostu ciśnienia dochodziło w niektórych przypadkach do 72 000 mmHg/s, a tempo spadku ciśnienia do 144 000 mmHg/s. Ponadto stwierdzono, że wzrost ciśnienia w transferowanym płynie był proporcjonalny do szybkości wstrzykiwania transferowanego płynu (1). Tak gwałtowne zmiany ciśnienia wynikają głównie z faktu, że tłok strzykawki insulinowej ma średnicę 4,75 mm i powierzchnię 17,34 mm<sup>2</sup>, podczas gdy wewnętrzna średnica katetera stosowanego w eksperymentach wynosiła 0,4 mm, a jego powierzchnia 0,125 mm<sup>2</sup>. Łatwo zauważyć, że średnica strzykawki jest

blisko 10 razy większa niż średnica katetera. Oznacza to, że ruch tłoka podczas wstrzykiwania nadaje znaczną szybkość transferowanemu płynowi, uwarunkowaną zarówno ciśnieniem przyłożonym do tłoka, jak i różnicą wewnętrznych średnic strzykawki i katetera. W rezultacie ruch tłoka strzykawki insulinowej o 1 mm powoduje przeniesienie około 140 razy większej objętości podłoża przez strzykawkę niż przez kateter. W przypadku zbyt energicznego naciśnięcia tłoka strzykawki, prędkość przepływu płynu we wnętrzu katetera może osiągać wartości dochodzące do 21 m/s. Zbyt szybki przepływ we wnętrzu katetera może prowadzić do powstania niekorzystnych warunków fizycznych charakteryzujących się między innymi gwałtownymi zmianami ciśnienia w transferowanym płynie.

Pomimo że do tej pory nie przeprowadzono badań dotyczących wpływu fluktuacji ciśnienia na potencjał rozwojowy zarodków, jednak w dostępnej literaturze opisywane są przypadki uszkodzenia komórek powstałe wskutek zmian ciśnienia (2-5).

Wong wraz ze współpracownikami przeprowadzili badania nad mechanizmem uszkodzenia komórek endotelium w przypadku stosowania embolizacji naczyń krwionośnych pęcherzykami powietrza. Okazało się, że przemieszczający się w naczyniu włosowatym pęcherzyk powietrza powoduje gwałtowny wzrost ciśnienia w płynie z przodu pęcherzyka, co z kolei doprowadza do uszkodzenia komórek śródbłonna (5).

W innych badaniach poświęconych mechanizmowi uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych u pacjentów poddanych mechanicznej wentylacji płuc wykazano, że głównym czynnikiem odpowiadającym za zakres uszkodzeń pneumocytów był gradient ciśnienia działający na komórki (4). Zespół badawczy pod kierownictwem Key'a przedstawił przekonujące dowody na to, że wielkość gradientu ciśnienia, działającego na pneumocyty, stanowi główny czynnik powodujący uszkodzenia błony komórkowej i wraz z jego zmniejszeniem spada ryzyko rozerwania cytolemmy. Ponadto, sam wzrost ciśnienia nie jest w stanie spowodować uszkodzeń komórek. Dopiero znaczny wzrost ciśnienia, po którym następuje gwałtowne obniżenie ciśnienia, może prowadzić do naruszenia struktur komórki. Wynika to z faktu, że struktury biologiczne ulegają uszkodzeniom pod wpływem rozciągnięcia czy rozerwania, a nie ściskania (6). Dlatego też stopień uszkodzenia komórek będzie zależał od amplitudy zmian ciśnienia działającego na komórki. Nie wielkie fluktuacje ciśnienia mogą co najwyżej odwracalnie zaburzyć czynność komórek, podczas gdy fluktuacje o znacznej amplitudzie mogą trwale uszkadzać komórki, uniemożliwiając ich dalsze prawidłowe funkcjonowanie. W dostępnej literaturze można odnaleźć dowody na to, że gwałtowne zmiany ciśnienia mogą uszkodzić istotne struktury komórkowe, takie jak: błonę komórkową (7, 8), cytoskeleton (9), czy też DNA (10-12). Interesujący jest też fakt, że ciśnienie ma bardzo istotny wpływ na depolimeryzację mikrotubul tworzących wrzeciono kariokinetyczne (13), jak też jest w stanie inaktywować enzymy wewnątrzkomórkowe (14, 15).

W badaniach własnych wykonanych na blastocystach mysich stwierdzono, że warunki fizyczne towarzyszące transferowi mogą powodować zarówno zmiany morfologiczne, jak i apoptozę komórek zarodka. W przeprowadzonym doświadczeniu poddawano blastocysty mysie transferowi do modelu jamy macicy z różnymi prędkościami wstrzykiwania (16). Odsetek blastocyst obkurczonych i zapadniętych po upływie godziny od przeprowadzenia ET był najwyższy w grupie poddanej „szybkemu” transferowi, prędkość wstrzykiwania > 1m/s i osiągnął 43%, podczas gdy w grupie poddanej „wolnemu” transferowi, prędkość wstrzykiwania < 0,1m/s, wyniósł 7%, a w grupie kontrolnej 10%. Najwyższy średni wskaźnik apoptotyczny odnotowano w grupie narażonej na „szybki” transfer, który osiągnął 52,2%. Niższe wskaźniki stwierdzono w grupie narażonej na „wolny” transfer – 25,6%, i w grupie kontrolnej – 12,8%. Interesującym wydaje się fakt, że nawet blastocysty z zachowaną prawidłową morfologią po ET wykazywały wartości wskaźnika apoptotycznego dochodzące do 86%. Szeroki zakres wartości indeksu apoptotycznego w zarodkach poddanych transferowi, od 5 do 93%, był prawdopodobnie spowodowany pozycją zarodka w transferowanym płynie i narażeniem na czynniki fizyczne towarzyszące ET. Należy zwrócić również uwagę na fakt, że obkurczanie i rozprężanie się blastocyst jest fizjologicznym zjawiskiem, które zostało po raz pierwszy opisane już na początku XX wieku (17). Uważa się, że nieznaczne obkurczanie się blastocyst jest naturalnym zjawiskiem i stanowi istotny element w procesie ich wykluwania, natomiast silne obkurczanie się może hamować ten proces (18). W badaniu własnym zapadnięte blastocysty obserwowano jedynie w grupie poddanej „szybkemu” transferowi. W warunkach fizjologicznych zarodki bardzo rzadko obkurczają się na tyle silnie, aby doszło do całkowitego zaniku blastocelów i zapadnięcia się blastocysty (19). Obserwowane zmiany morfologiczne w blastocystach oraz wysokie wartości wskaźnika apoptotycznego wskazują, że fluktuacje ciśnienia podczas ET mogą osiągać wartość progową, powyżej której następuje uszkodzenie komórek zarodka.

Podsumowując, należy stwierdzić, że stosując standardowy zestaw do ET złożony z sondy i strzykawki insulinowej, można stosunkowo łatwo osiągnąć wysokie wartości ciśnienia w transferowanym płynie. Wraz ze wzrostem szybkości wstrzykiwania obserwowany jest wzrost ciśnienia oddziałującego na zarodek wewnątrz sondy. Biorąc pod uwagę fakt, że nasilenie zmian morfologicznych oraz apoptotycznych w transferowanych zarodkach wzrasta wraz z prędkością wstrzykiwania, należy zalecić, aby ET był wykonywany z jak najmniejszą prędkością wstrzyknięcia. □

#### Piśmiennictwo

1. Grygoruk C, Sieczyński P, Pietrewicz P et al.: Pressure changes during embryo transfer. *Fertil Steril* 2011; 95: 538-41.
2. Bilek AM, Dee KC, Gaver DP: Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *Journal of Applied Physiology* 2003; 94: 770.
3. Bui BV, Edmunds B, Cioffi GA et al.: The

- gradient of retinal functional changes during acute intraocular pressure elevation. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005; 46: 202.
4. Kay SS, Bilek AM, Dee KC et al.: Pressure gradient, not exposure duration, determines the extent of epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *Journal of Applied Physiology* 2004; 97: 269.
5. Wong Z, Fowlkes J, Bull J: A study of cell damage caused by bubble motion in a circular-lumen endothelialized model of a microvessel. *FASEB J* 2008; 22: 1220.
6. Sellier KG, Kneubuehl BP: Wound ballistics and the scientific background: Elsevier Science Health Science div, 1994.
7. Ayaz P, Siddigi S, Titchener-Hooker N: A physical model of high-pressure disruption of bakers' yeast cells. *Chemical Engineering Science* 1995; 50: 1383-1391.
8. Wright M, Stockwell R, Nuki G: Response of plasma membrane to applied hydrostatic pressure in chondrocytes fibroblasts. *Connective Tissue Research* 1992; 28: 49-70.
9. Moosavi-Nejad SF, Hosseini SH, Satoh M et al.: Shock wave induced cytoskeletal and morphological deformations in a human renal carcinoma cell line. *Cancer science* 2006; 97: 296-304.
10. Endl E, Steinbach P, Hofstadter F: Flow cytometric analysis of cell suspensions exposed to shock waves in the presence of the radical sensitive dye hydroethidine. *Ultrasound in medicine & biology* 1995; 21: 569-577.
11. Miller DL, Thomas RM, Buschbom RL: Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasonic cavitation in vitro. *Ultrasound in medicine & biology* 1995; 21: 841-848.
12. Kochanski AM, Mejnartowicz JP, Latos-Bielenska A et al.: DNA damage induced by lithotripter generated shock waves: short report. *International urology and nephrology* 2001; 32: 419-422.
13. Salmon ED: Pressure-induced depolymerization of spindle microtubules. I. Changes in birefringence and spindle length. *The Journal of cell biology* 1975; 65: 603-614.
14. Dreyfus G, Guimaraes-Motta H, Silva JL: Effect of hydrostatic pressure on the mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* 1988; 27: 6704-6710.
15. Paladini AA Jr., Weber G: Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry* 1981; 20: 2587-2593.
16. Grygoruk C, Sieczynski P, Modlinski JA et al.: Influence of embryo transfer on blastocyst viability. *Fertil Steril* 2011; 95: 1458-1461.
17. Lewis WH, Gregory PW: *Cinematographs of Living Developing Rabbit-Eggs*. Science New York, NY 1929; 69: 226-229.
18. Suzuki R, Niimura S: Hatching and distribution of actin filaments in mouse blastocysts whose activities of protein kinase A were suppressed by H-89. *The Journal of reproduction and development* 2010; 56: 103-109.
19. Niimura S: Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *The Journal of reproduction and development* 2003; 49: 413-423.

nadesłano: 25.04.2012

zaakceptowano do druku: 14.05.2012

Adres do korespondencji:

\*Cezary Grygoruk

Centrum Ginekologiczno-Położnicze „Bocian”

ul. Akademicka 23, 15-267 Białystok

tel.: +48 (85) 744-77-00

e-mail: cezary.grygoruk@gmail.com