



národní
úložiště
šedé
literatury

Kryokonzervace gamet a embryí v asistované reprodukci

Hanzelka, Zdeněk
1993

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-394975>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 17.07.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

2641

Lékařská fakulta Masarykovy university v Brně

KRYOKONZERVACE GAMET A EMBRYÍ
V ASISTOVANÉ REPRODUKCI

KANDIDÁTSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE

Brno 1993

MUDr. Zdeněk HANZELKA

Lékařská fakulta Masarykovy university v Brně

KRYOKONZERVACE GAMET A EMBRYÍ

V ASISTOVANÉ REPRODUKCI

Kandidátská disertační práce

Autor: MUDr. Zdeněk Hanzelka

Školitel: prof. MUDr. Ladislav Pilka, DrSc

Brno 1993

Obsah

1. Úvod	3
2. Přehled o současném stavu problematiky	4
3. Cíl práce	23
4. Metodická část	28
4.1. Kryokonzervační zařízení	28
4.2. Kryokonzervační médium	30
4.3. Pomalá metoda kryokonzervace spermií	31
4.4. Rychlá metoda kryokonzervace spermií	32
4.5. Získávání vzorků spermií	33
4.6. Zpracování vzorků spermií	33
4.7. Příprava mikroskopického preparátu	34
4.8. Fotografování spermií	34
4.9. Kryokonzervace oocytů	35
4.10. Kryokonzervace embryí	36
5. Výsledky	39
5.1. Motilita spermií po kryokonzervaci	39
5.2. Stav oocytů po kryokonzervaci	40
5.3. Stav embryí po kryokonzervaci	41
6. Diskuse	42
7. Závěr a návrh na využití poznatků v praxi	48
8. Souhrn	51
9. Literatura	56
10. Přílohy (grafy a vyobrazení)	75

Seznam použitých zkratek a cizích výrazů

AIUI	arteficielní intrauterinní inseminace
CECOS	Centre d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains
DIPI	Direct Intra Peritoneal Insemination of Sperm
DMSO	dimetylsulfoxid
ES	Evropské společenství
ESHRE	The European Society of Human Reproduction and Embryology
ET	embryotransfer
FCS	fetal calf serum
GIFT	Gamete Intra Fallopian Transfer
IUI	intrauterinní inseminace
IVF	in vitro fertilizace
KDL	komplexní diagnostická laparoskopie
M	molární
PBS	phosphat buffered solution
POST	Peritoneal Ovum Sperm Transfer
PROH	propandiol
PROST	transfer pronukleárního stádia do vejcovodu
Seeding	indukce tvorby ledových krystalů
TET	tubární transfer embrya
ZIFT	transfer zygoty do vejcovodu

1. Úvod

Manželská sterilita se v populaci vyskytuje asi u 15-20% dvojic, které si přejí mít dítě, ale mají problémy s uskutečněním tohoto záměru bez lékařské pomoci.

Využití různých metod asistované reprodukce, která zahrnuje poradenství, endokrinní léčbu, IVF atd., představuje naději těchto párů splnit svoje základní lidské poslání - mít dítě. WHO definovala manželskou sterilitu jako nemoc. Základním lidským právem je nárok na léčení nemoci a to znamená, že všichni lidé mají právo na reprodukční zdraví. Cílem asistované reprodukce je realizace tohoto základního práva v praxi a optimalizace přirozené fertilitní schopnosti páru. Procento nedobrovolně bezdětných párů, kterým nemůže asistovaná reprodukce pomoci je asi 3-4% (68). U 30% párů, které se léčí pro neplodnost je její etiologie způsobena mužskou patologií a u dalších 15% je mužský faktor spojený s ženským faktorem (27). V podmínkách současného vědeckého poznání a stavu reprodukční medicíny je komplexní využívání technik a technologií asistované reprodukce předpokladem úspěšné léčby manželské neplodnosti.

Kryokonzervace lidských gamet a embryí patří k moderním metodám, které asistovaná reprodukce používá. Předmětem této studie je kryokonzervace lidských spermií a embryí a experiment s kryokonzervací oocytů v programu asistované reprodukce.

2. Přehled o současném stavu problematiky

Kryokonzervace umožňuje reverzibilně zastavit vývoj lidských gamet i embryí, která mohou být v tomto stavu dlouhodobě uchovávána. Zmrazování biologického materiálu našlo již dávno své opodstatnění v řadě vědních disciplín. První zprávy o úspěšné kryokonzervaci podal v roce 1776 Spalzani, který referoval o přežití spermií zmražených ve sněhu (52). V roce 1972 bylo poprvé referováno o narození živých myši po transferu preimplantačních embryí, která byla uchovávána při nízkých teplotách (124). Postupně byla metoda kryokonzervace zvládnuta u dalších savčích druhů, jako králíka (9), krysy (125), ovce (128), kozy (11) a krávy (100). Tyto úspěchy kryokonzervační techniky na laboratorních zvířatech byly impulsem pro zavedení kryokonzervace do procesu reprodukce hospodářských zvířat. Zmrazování embryí skotu ve stádiu moruly až blastocysty, to je útvaru o 60 - 150 a více buňkách s diferencujícím se nebo již diferencovaným zárodečným terčíkem a trofoblastem, odpovídajícím sedmému dni vývoje se provádí se střídavými úspěchy již celou řadu let (92) nicméně, s konečnou platností stále není dořešeno. Dodnes se objevují stále nové práce (67, 89, 74, 69), které krok za krokem přispívají ke zlepšení a zdokonalování metodiky zmrazování a rozmrazování gamet a embryí, i ke zvyšování efektivity této metody v jejím praktickém využívání. Kryokonzervace gamet a embryí, i když je dnes velmi propracována, je a stále zůstává nejvyšším

stupněm zkoušky rezistence buněk. Jeho úspěšnost závisí na splnění řady kritérií a podmínek fyzikálního a chemického charakteru, které v průběhu zmrazovacího i rozmrazovacího procesu zaručí nejen zachování struktur jednotlivých buněčných orgánů a membrán, ale umožní především zachování funkce tak, aby další vývoj mohl pokračovat v plné míře. Při kryokonzervaci embryí se většinou předpokládá, že savčí embrya by se vůči hlubokému chlazení měla chovat stejně jako třeba embrya myši (59,61). Nicméně je třeba říci, že při kryokonzervačním procesu se ani v témže embryu daného druhu jednotlivé blastomery v důsledku rozdílů jejich velikostí a propustnosti membrán nechovají stejně a rovněž stádia vývoje embryí různých druhů zvířat rovněž vyžadují odlišné kryobiologické parametry (75).

Při kryokonzervaci savčích buněk a embryí hlubokým chlazením je naděje na jejich přežití závislá na řadě kryobiologických principů (64,65,67,84), z nichž je třeba zdůraznit:

1. typ a konzervace kryoprotektivních látek
2. tvorba ledu při zmrazování
3. rychlost zmrazování do nízkých podnulových teplot
4. kryokonzervační teplota
5. rychlost rozmrazování z -196 stupňů Celsia do nadnulových hodnot
6. odstranění kryoprotektiva a návrat do fyziologických podmínek a funkcí

Jedním ze základních principů kryokonzervace a přežívání gamet a embryí je typ a koncentrace kryoprotektivních látek, respektive roztoků, do nichž se embrya nebo gamety před zmrazením vkládají. Jde o organické látky s nízkou molekulární hmotností, které jsou dobře rozpustné ve vodě a nejsou zvláště toxické i při vyšších koncentracích (67). Těchto kryoprotektiv je dnes známá již celá řada a v zásadě se dělí na látky volně permeabilní a kryoprotektiva nepermeabilní.

K prvním patří dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, betapropandiol, ethylenglykol, propylenglykol, methanol (98), druhé reprezentují polymery polyvinylpyrrolidon, albumin, sacharóza, dextrany a polyethylenglykol (18).

V současné době se používá ke kryoprotekci nejčastěji glycerol (106, 17), jehož penetrační vlastnosti v závislosti na teplotě prostředí prokázal (43,44) za pomoci značeného glycerolu. Při nízkých teplotách penetruje glycerol pomalu, při stoupajících podstatně rychleji (67).

Nepermeabilní kryoprotektiva, jako je dnes běžně používaná sacharóza, se dnes používají jako pomocné substance ve směsi s glycerolem nebo jiným permeabilním kryoprotektivem k rychlé dehydrataci buněk nebo jako protektivum při vymývání kryoprotektiva z buněk po rozmrazení.

Glycerol a jiná permeabilní kryoprotektiva pronikají do buňky v závislosti na permeabilitě buněčných membrán a spádu

koncentrací, volnou difuzí. Jejich skutečná a účinná ochrana proti mrazení nastupuje až po dosažení chemické ekvilibrace (82,33,44), avšak jejich ochranný mechanismus není dostatečně osvětlen (92).

Někteří autoři (70, 23, 77, 81, 62, 63, 64, 65, 67, 86, 75, 127, 47, 58, 84, 18), vidí ochranný efekt penetrativních kryoprotektiv ve snížení bodu mrazu a přítomnosti nepermeabilních kryoprotektiv se zase připisuje stabilizační účinek na buněčné membrány (77,85,101). Za přítomnosti kryoprotektiv dochází k odtoku volné vody a tím i ke změnám buňky. V důsledku hyperosmolarity extracelulárního média a vysoké permeability buněčných membrán se jednotlivé buňky zmenšují a snižování jejich objemu trvá až do vzniku osmotické rovnováhy mezi vyplavovanou vodou a vtokem kryoprotektiva. Čím je koncentrace kryoprotektiva a teplota prostředí vyšší, tím rychleji dojde k dehydrataci, a tím i ke kryoprotekci buňky, a dosáhne se tzv. chemické ekvilibrace. Kryoprotekci je nutno provádět velmi pečlivě, jinak může docházet k poškození buněk ještě před vlastním mražením. V tomto směru je třeba brát v úvahu koeficient permeability kryoprotektiva, který je závislý na membránovém koeficientu permeability velikosti povrchu buněk a rozdílu molarit extracelulárního a intracelulárního kryoprotektiva. Jak již bylo výše uvedeno, dochází při vložení gamet či embrya do hypertonického roztoku kryoprotektiva v důsledku ztráty vody k výrazným objemovým změnám jednotlivých buněk. K prevenci náhlých objemových změn se dříve používalo stoupající řady

koncentrací kryoprotektiva (3 - 6 - 10%) v 7 - 10 min. časových intervalech (128, 88, 53, 108, 91), později však bylo dosaženo srovnatelných výsledků též vložem embryí do konečné koncentrace (1 - 1,5 M) kryoprotektiva samotného (124, 59, 100, 35, 66, 94, 113), to je do koncentrace 1 - 1,5 M nebo s přidavkem určitého podílu (0,3 M sacharózy).

Jiní autoři (40) zjišťovali přežívání embryí skotu v různých stupňovitých podílech glycerolu až do konečné 1,4 - 1,5 M koncentrace v závislosti na různé délce ekvibrace. Mezi jednorázovým a stupňovitým vzestupem koncentrace glycerolu nebylo zjištěno výrazných rozdílů, ale přežívání po rozmrazení bylo výrazně ovlivněno délkou ekvibrace embrya na jednotlivé koncentrace glycerolu v délce 2, 10 a 30 minut. Ukázalo se, že minimální délka ekvibrace vyžaduje dobu nejméně 10 minut na každou koncentraci vzestupné řady kryoprotektiva a kratší expozice embryí ovlivňuje přežívání po rozmrazení negativním způsobem. Vzhledem k permeabilním vlastnostem embryonálních buněk závislých na teplotě prostředí, byly v posledních letech vyvinuty velmi rychlé a jednoduché metody kryokonzervace (67,69,93), ve formě vitrifikace. Gamety nebo embrya jsou ve dvou fázích vystavovány nejprve nižším, a pak vysokým koncentracím kryoprotektiva (99,73,69) nebo směsí kryoprotektiv (10% glycerolu a 20% 1,2 M propandiolu resp. 20% glycerolu a 20% propandiolu, případně 4,1 M glycerolu) k vyvolání vysokého stupně dehydratace embrya a zabránění krystalizace média. Za těchto podmínek zmrazovací médium při bleskovém zchlazení

nevymrzá, ale při vhození do tekutého dusíku tuhne ve sklu podobnou masu, která celému procesu propůjčuje název **vitřifikace**. Nepochází zde z časových důvodů k nitrobuněčné krystalizaci, ale při vymrznutí vody se může nepříznivě projevit toxicita kryoprotektiva i negativní vliv osmotických poměrů na buňku. Podle Liehmana 1990 tato metoda poskytuje až 45 - 50% přežívání *in vivo*. Druhým principem i problémem klasické kryobiologie je změna osmotických poměrů mezi buňkou respektive buňkami a extracelulárním prostředím v souvislosti s tvorbou ledové krystalizace v konzervačním médiu a buňkách samotných. Nutno předeslat, že bod mrazu určitého roztoku je závislý na počtu molekul v roztoku rozpuštěných. Bod mrazu izotonického roztoku NaCl (0,165 M) se pohybuje kolem - 0,6 °C, nicméně bod mrazu téhož roztoku s obsahem 1, 2 nebo 3 M glycerolu klesá na 1,9 - 8,1 °C. To znamená, že ledová krystalizace bude probíhat až po dosažení uvedených chladových hodnot. Nicméně při zmrazování je třeba respektovat skutečnost, že i vodné roztoky se při zchlazování určitého malého objemu dají podchládit hluboko pod vlastní bod mrazu bez tvorby ledu. Tento fenomen podchlazení (o 10 - 15 °C pod vlastní bod mrazu) může v přežitelnosti zmrazovaných buněk hrát kritickou roli. Když se buňka přenesse z izotonického roztoku do roztoku hypertonického, reaguje osmoticky ztrátou vody, aby došlo k vyrovnání mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím. Rychlost, kterou se daný typ buňky osmoticky přizpůsobuje, je dána hydraulickou vodivostí nebo koeficientem vodní permeability a souvisí s poměrem velikosti povrchu buňky k jejímu objemu a

dále teplotou prostředí. Hydraulická vodivost se u jednotlivých druhů buněk liší. Vysokou konduktivitu mají kupříkladu savčí erytrocyty, nižší je u leukocytů a nejnižší u vajíček a embryí (84). Exaktní pokusy ukázaly, že embrya vystavená vyšším koncentracím kryoprotektiv se v průběhu prvních 6 minut zmenšují, ale v dalších 10 minutách dochází k jejich reexpanzi. Je to důsledek známých osmotických změn buněk (59), vystavených hyperosmotickým roztokům permeabilních látek. Počáteční zmenšení embryí je vyvoláno ztrátami vody, které probíhají rychleji, než vtok kryoprotektiv. Zmenšování objemu však končí, když se vytvoří přibližné osmotické equilibrium mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím, což trvá asi 6 - 15 minut. Pak buňky znovu pomalu nabývají objemu, protože do nich vstupuje kryoprotektivum s vodou, aby se udržela osmotická rovnováha.

Při zchlazování je stupeň přežívání buněk závislý na rychlosti snižování teploty a kinetice ztrát vody v průběhu mrazícího procesu, t.j. od teploty - 7 až - 9 ° a níže, kterou Mazur (76) vyjádřil rovnicí vyplývající z teploty, rychlosti zchlazování, konstanty vodní permeability buněk, teplotního koeficientu této konstanty a poměru povrchu buněk k jejich objemu. Na základě numerického řešení této rovnice Mazur (76) mohl vysvětlit pokles stupně přežívání, který se vyskytuje při vyšších zmrazovacích rychlostech. Tentýž autor rovněž zjistil, že jsou-li buňky chlazeny na podnulové teploty, tvoří se krystalky ledu nejdříve v médiu a buňka, než dojde ke změně fáze, se podchlazuje (63). Tvorbou

mikrokryсталů ledu extracelulárním prostředí se vytváří výrazná chemická diference mezi intracelulárními a extracelulárními tekutinami. Takto vzniklá vysoká extracelulární koncentrace solí pak vede k tvorbě určitého chemického potenciálu, který působí zevně na ještě nezmrazená embrya (77). V závislosti na rychlosti zchlazování se rozdílné intra a extracelulární chemické potenciály vyrovnávají dvojitým způsobem (83,80,64,109). Při pomalém chlazení probíhají chemické a osmotické změny v embryích téměř současně se změnami v médiu. V důsledku extracelulárního zahušťování solí dochází v mrznoucím médiu k značnému odtoku intracelulární vody s navazující progresivní dehydratací embrya. Buňka tak může do extracelulárního prostředí odevzdat až 90% své volné vody (76), což vede k jejímu výraznému zmenšení i k zvýšení koncentrace solí v ní samotné. Jestliže pokles teploty překročí kritické hodnoty a zchlazování je rychlejší, je výtok nitrobuněčné vody závislý na vlastnostech embryonálních buněčných membrán, t.j. na nízké permeabilitě a zmenšeném poměru buňky k jejímu objemu omezen až znemožněn (76,64,101). Termodynamická rovnováha se pak musí uskutečnit cestou intracelulární krystalizace, jejíž průběh je přímo závislý na rychlosti zchlazování a stupni podchlazení buněčného materiálu (21). Při přímém mikroskopickém pozorování krystalizace ledu bylo zjištěno, že při zmrazovací rychlosti 0,7 st C/ min. zůstává do - 20 °C až 90% myších embryí morfologicky nezměněno, zatímco při rychlosti 12 °C/min. je většina z nich zničena. Pomalé zchlazování tedy poskytuje buňkám dostatek času k průběhu

dehydratace, která je v průběhu zmrazování reakcí na změny osmotického tlaku a chemického potenciálu, zatímco rychlé zmrazování tuto dehydrataci neumožní, takže voda zmrzne intracelulárně. Intracelulární krystalizace samozřejmě vede k mechanickému poškození buněčných struktur a tím i k zániku buňky (76,62,63,84). Na základě pozorování oocytů a embryí myši bylo zjištěno, že buňky mohou obsahovat vodu schopnou zmrznutí až do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a více (63). Právě z toho důvodu musí být embrya zmrazena pomalu, aby se udržovala osmotická rovnováha s jejich okolím. Pro embrya savců byla optimální rychlost zchlazování stanovena na 0,3 až 0,8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Podle Asahina a spol.(5), však rychlé chlazení s tvorbou intracelulární krystalizace nemusí vždy vyvolat letální defekty buněk. Tento fenomén je závislý na velikosti tvořících se krystalků ledu (81,104), a pak na rychlosti zmrazování. Při rychlejším zmrazování vznikají jen malé intracelulární krystalky, které při pomalejším rozmrazování v důsledku jejich vysoké povrchové energie splývají ve větší tzv. rekrystalizace, která buňky ničí. Ve fázovém kontrastu je tato reakce mikroskopicky patrná v teplotním intervalu od -85 do $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a je patrná jako tzv. zablesknutí (flashing) embrya (60,97,57). Takto vzniklé ledové krystaly poškozují v průběhu rozmrazování mikrostrukturu buněčných membrán a organel (8,64,87) ve větší nebo menší míře. Poškození buněk může však vznikat i v průběhu pomalého zmrazování v důsledku jevu zahrnovaného pod pojem solution effect nebo Losungseffekt. Tento fenomén je vyvolán značným vzestupem intracelulární koncentrace solí v dehydratovaných embryích,

kdy podle Mazura (77,78) dochází k závažnému narušení biochemické skladby buněk v důsledku makromolekulárních solí atd., které ve svém komplexu vrcholí ve formě tzv. osmotického buněčného šoku. Zatímco jistá část autorů považuje vysoké koncentrace solí a z toho vyplývající poškození membrán za příčinu osmotické lýzy embryí již při jejich zmrazování (81, 107), jiní mají za to, že příčinou zániku buněk může být též překročení minimálního objemu v důsledku silné dehydratace, která vede k poškození buněčných membrán (79, 105, 130), a tím i k poruchám až zániku celulárních funkcí vůbec. Překročení hranice minimálního objemu buněk v průběhu zmrazování a vznikající osmotický tlakový gradient poškozuje zejména činnost buněčné membrány ztrátou lipidů, což umožňuje pronikání extracelulárních solí do nitra buněk s dalšími osmotickými změnami v průběhu rozmrazování. Rozsah redukce buněčného objemu se od buňky k buňce mění a jestliže restrikce překročí kritické stádium původního objemu, vznikají na membránách a cytoskeletu ireversibilní změny takového rázu, že limitují další přežívání (130) i v důsledku narušení buněčného metabolismu (16) po rozmrazení. Tak se mohou kupříkladu poškodit lysosomy, nebo může dojít k uvolnění fermentů, které pak stráví ostatní buněčné orgány. Při poškození mitochondrií je zase narušen oxidační řetězec (87) a omezení buněčné vitality po rozmrazení. Griffiths a spol. (30) zase tvrdí, že nebezpečné je i rychlé rozmrazení, kdy do hypertonického celulárního prostoru proudí masy vody tak rychle, že vyvolají prasknutí buňky. Při nízkých rychlostech zmrazování a při

relativně malém objemu zmrazovaného objektu, jak je to při zmrazování buněk a embryí běžné, zpravidla dochází k již zmíněnému výraznému podchlazení (supercooling), které podléhá nekontrolovatelné a spontánní krystalizaci. Podle Whittinghama (126) při podchlazení dochází mimo jiné i k poškození buněčných membrán (101) s následnými poruchami permeability, které více nebo méně ovlivňují přežitelnost embryí po rozmrazení.

Leibo (64) i Schwartz a Diller (109) však mají zato, že podchlazení je pro buňku osudné proto, že průběh dehydratace nemůže za tohoto stavu proběhnout v dostatečné míře a tak při spontánním nástupu ledové krystalizace média musí dojít k intracelulární tvorbě ledu. Buňky tak v důsledku chybějícího osmotického gradientu nemohou při podchlazení odevzdávat do extracelulárního prostoru svoji vodu plynule, takže při vzniku rychlé krystalizace, kdy je výstup vody navíc zpomalen, může buňka obsahovat ještě polovinu jejího počátečního množství. A to se při spontánní krystalizaci stává pro buňku fatální.

Aby se předešlo škodlivému vlivu podchlazení a vzniku spontánní a nekontrolovatelné krystalizace mrazeného objektu, vyvolává se změna skupenství extracelulárního média uměle a to na úrovni teplot jen o něco málo nižších, než je bod mrazu daného kryoprotektiva. Toto umělé vyvolání pomalé krystalizace je známo pod pojmem seeding a v závislosti na koncentraci kryoprotektiva se provádí při teplotě -5 až -7 °C.

Provokace této ledové krystalizace (seeding) je snadná a lze ji podnítit bodovým dotykem zmrazovaného objektu kovovým předmětem (tyčinka, peán, pinzeta) podchlazeným v tekutém dusíku. Vytvořený malý krystalizační bod se pomalu difusně šíří, pozvolna prostupuje celým zmrazovaným vzorkem a dá se dobře zrakově kontrolovat. Čím je proces krystalizace plynulejší, tím jsou i výsledky přežívání embryí lepší (110). Ukázalo se, že teplota při vyvolávání seedingu je pro přežívání embryí velmi důležitá. Čím je od bodu mrazu kryoprotektiva vzdálenější, tím je přežívání embryí nižší (88,126,129,55,117,101,58,92). Vyvolávání umělé krystalizace pod teplotou - 10 °C vede většinou k destrukci embryí.

Až do roku 1978 byla propagována metoda pomalého zchlazování a pomalého rozmrazování buněk a embryí (126,131,128,55,117). Sledovala se tím jak úplná dehydratace embryí při zchlazování, tak i jejich šetrná rehydratace při rozmrazování. Tato zdlouhavá metoda, která současně vyžadovala náročná mrazicí zařízení, byla posléze nahrazena metodou rychlého zmrazování (128, 33, 72, 12, 56), kde pomalé snižování podnulové teploty končilo na hranici - 30 až - 40 °C s následným rychlým ponořením vzorků do tekutého dusíku (plung). Při tomto způsobu chlazení sice může docházet k intracelulární tvorbě ledu (krystalizaci), ale krystalky jsou jen malé, rozptýlené a v nepatrném množství, takže buňky a jejich struktury prakticky nemohou narušit. Chlazení, které končí jen na úrovni - 25 °C s následným rychlým zmrazením v tekutém dusíku, má za následek častější defekty (ruptury) na

zonách (57). Metoda zmrazování byla postupem času ještě dále časově zkrácena, když se zjistilo, že kryoprotektivy ošetřené gamety a embrya se mohou bez újmy vložit přímo do seedingové teploty (- 5 až - 7 °C). Po krátké ekvilibraci (5 - 10 minut) se vyvolá vlastní proces seedingu s následným zchlazováním o 0,3 až 0,5 °C/ min. až do teploty - 30 °C, kde se udržují po dobu 10 - 15 minut. Pak se přímo vkládají do tekutého dusíku (64,100), kde se též konzervují. Od vitrifikace se tyto techniky odlišují nejen použitým kryoprotektivem (glycerol, DMSO, PROH, sacharóza), u vitrifikace se používá VS 1, ale i rychlostí zmrazování, která je u vitrifikace -2000 °C/min. (111,26).

Pro přežívání zmrazených gamet a embryí má velký význam zachování konstantní konzervační teploty, při níž jsou embrya uchovávána a manipulována. Dnes se zpravidla gamety a embrya udržují v podmínkách tekutého dusíku, tj. při - 196 °C, nebo v dusíkových párách o teplotě kolem - 150 °C, kde bez úhony vydrží quo ad functionem řadu let. Větší teplotní výkyvy nejsou přípustné, protože tak může dojít k rekrystalizačním intracelulárním procesům a tím i ke shora uvedenému narušení buněčných struktur, které ovlivňují přežívání buněk po rozmrazení.

Velmi důležitou součástí zmrazovacího procesu je rychlost rozmrazování, která je závislá na rychlosti zmrazování. Zmrazují-li se gamety a embrya až do nízkých teplot pomalu, vyžadují i pomalou rychlost rozmrazování. Výsledky přežívání v závislosti na rychlosti zmrazovacího a rozmrazovacího

procesu se dají vysvětlit na základě permeability vody podobně, jak tomu bylo při zmrazování.

Gamety nebo embrya chlazená pomalu mají dostatek času k dehydrataci, zatímco v opačném případě tuto možnost nemají.

Embrya a gamety chlazené pomalu dosahují maximálního stupně dehydratace a jsou vystavovány silnému "solution effectu" ze strany zmrazeného média. Při pomalém rozmrazování se tyto rozdíly pomalu upravují, buňky zůstávají v přibližném osmotickém ekvilibriu a tak podléhají pomalé rehydrataci. Jsou-li pomalu zmrazované gamety a embrya rozmrazena rychle, probíhá rychle i rehydratace a buňky podléhají zkáze.

Provádí-li se tedy zmrazování rychlé, vyžaduje to též rychlé rozmrazování. Za rychlé zmrazování považujeme ty metody, kdy se embryo do tekutého dusíku vkládá při teplotách do - 50 °C.

Rychlé rozmrazení se v případě "rychlého" chlazení provádí proto, aby se předešlo fenoménu rekrytalizace při teplotách od - 80 do - 50 °C a tvorbě velkých krystalů ledu v buňkách (96, 64). Provádí se jednoduše tak, že se zmrazené vzorky přenesou do vodní lázně o teplotě 20 - 37 °C, takže rychlost rozmrazení dosahuje 300 a více stupňů /minutu. Stejně účinně se dají pejety rozmrazovat při teplotě vody z vodovodu (72) na předehřátém stolku nebo v dlani (65). Rozmrazování kolem 37 °C nevedlo k většímu poškození embryí (102, 40, 58). Rozhodující význam pro další přežívání rozmrazených buněk má rychlé a šetrné vyplavení potencionálně toxického

kryoprotektiva z embryonálních buněk, zajištění procesu rehydratace a jejich návratu do původního funkčního stavu.

Vloží-li se po rozmrazení embrya přímo do izotonického roztoku PBS (phosphat buffered solution), dochází k osmotickému šoku a zničení buněk, protože vtok vody je rychlejší, než výtok kryoprotektiva.

K vyplavení kryoprotektiva jsou v zásadě k dispozici dvě metody.

Dosud se často užívá způsob stupňovitého vymývání, kdy embrya procházejí 3 - 6 stupni snižujících se koncentrací glycerolu, vždy v 10 minutových intervalech. Posledním stupněm je izotonické médium PBS s obsahem FCS (fetal calf serum) nebo bovinního albuminu, v němž se též embrya rekultivují.

Tato časově náročná metoda vymývání kryoprotektiva byla podstatně zjednodušena nasazením semipermeabilní sacharózy (63,48).

Semipermeabilní nepenetrující sacharóza zvyšuje osmotický tlak v extracelulárním prostoru a tím omezuje vtok vody do buněk, respektive embrya. Příjem vody je tak závislý na osmolaritě kryoprotektiva, resp. roztoku sacharózy. Působí-li sacharóza v hypoosmolarické koncentraci, proudí voda do buněk omezeně a objem buňky narůstá až téměř k maximálním hodnotám. Nepokračuje-li růst buňky dále, nedochází k žádným celulárním změnám, protože mikroklky na povrchu buněčných

membrán tyto celulární membrány do jisté míry ochraňují. Nutno podotknout, že čím je koncentrace sacharózy nižší, tím je vyplavování glycerolu delší a časově náročnější.

Působí-li sacharóza v isoosmolarické koncentraci, difundují kryoprotektiva a buněčná voda z embryí společně, a buňky resp. embrya se nadále zmenšují a teprve v živném roztoku nebo v uteru dosáhnou původního objemu.

Používá-li se sacharóza v koncentraci mezi 0,5 až 1 M, odplavuje se kryoprotektivum rychleji, protože mezi intra a extracelulární koncentrací kryoprotektiva vzniká vyšší koncentrační gradient a tak může glycerol, případně jiné kryoprotektivum, rychle z buněk odejít. Relativně velké množství extracelulárního vymývacího média zřeďuje vyplavované kryoprotektivum tak, že zde je jeho koncentrace zanedbatelná (106).

Na tomto principu je též založena zmrazovací metoda zvaná one step (64,101), kdy v jedné pejetě je v malém sloupci kryoprotektiva uloženo embryo a ve druhém, podstatně větším je rezerva vymývacího roztoku sacharózy, který je v průběhu mrazení a kryokonzervace od kryoprotektiva oddělen vzduchovou bublinou (obr. 1). Tyto dvě složky se smíchávají až po rozmrazení, aby se ihned mohlo uskutečnit vyplavení glycerolu. K rehydrataci embryí pak dochází až v uteru po bezprostředním přenosu embryí. Metoda one-step zdánlivě celý proces zmrazování zjednodušila, ale do praxe zvláště nepronikla vzhledem k tomu, že vylučuje kontrolu embryí. V řadě případů

se totiž přenášejí embrya značně poškozená nebo mrtvá, což snižuje pravděpodobnost otěhotnění.

Literární údaje o úspěšnosti kryokonzervace lidských oocytů a jejich následném oplození, které by vedlo ke graviditě jsou málo četné. Zatím jsou známy dva případy úspěšných gravidit po oplození kryokonzervovaných lidských oocytů. (39,123). Jako kryoprotektivního média bylo většinou autorů použito stejné médium, jaké se používá ke kryokonzervaci embryí (1,5 M DMSO s 0,1 M sacharózou a 20% FCS (26,110,111,20,121,91,38,2,93). Celá řada autorů se domnívá, že při kryokonzervaci oocytů může dojít k poškození mikrotubulů, Golgiho aparátu a meiotického vřeténka a tím ke vzniku chromozomálních aberací. Vzhledem k tomu tito autoři považují zavedení kryokonzervace oocytů do klinické praxe za riskantní a použití této metody zatím nedoporučují (29,50,122,91,42). Kryokonzervační techniky, které byly úspěšně zavedeny ve veterinární medicíně vzbudily zájem o užití této reprodukční technologie také v humánní medicíně. Neustálé zdokonalování technik využívaných v asistované reprodukci a zdokonalování ovariální stimulace vedoucí k získu velkého počtu preovulačních oocytů a tudíž následnému transferu velkého počtu embryí v jednom cyklu nese s sebou rizika vícečetných těhotenství, která přinášejí rizika jak pro matku, tak pro plody. Z těchto důvodů je zavedení kryokonzervace tzv. nadpočetných embryí metodou, která umožňuje uchování zmrazených embryí pro jejich transfer v některém z dalších cyklů. Někteří autoři dokonce

předpokládají, že zavedení kryokonzervace do programu in vitro fertilizace (IVF) zlepší jeho úspěšnost o dalších 8 - 12% (120).

Asistovaná reprodukce také využívá různé inseminační techniky:

1. vaginální - deposice ejakulátu do zadní klenby poševní
2. cervikální - instalace spermií do cervikálního kanálu
3. intrauterinní (IUI) - zavedení propraných a kapacitovaných spermií do dutiny děložní

4. přímá intraperitoneální inseminace (DIPI) - dopravení propraných a kapacitovaných spermií za pomoci vaginální UZ sondy a speciálního transferového setu do blízkosti stimulovaného ovaria. Všechny tyto inseminační techniky mohou být použity ve formě homologní tzn. s využitím spermií manžela a nebo heterologní s využitím spermií dárce. Při posledně jmenované metodě je nutné pracovat se spermii kryokonzervovanými, aby byla vyloučena možnost přenosu AIDS. Tento pokyn vydalo Ministerstvo zdravotnictví a sociálních věcí ČSR v roce 1988 na základě závěrů IV. Mezinárodní konference o AIDS, která se konala ve dnech 12. - 17. 6. 1988 ve Stockholmu. Tímto pokynem se s okamžitou platností zastavuje provádění oplodnění čerstvým semenem dárce po jeho předchozím jednorázovém vyšetření na anti HIV. Tento způsob nevylučuje možnost, že dárce byl již v době vyšetření infikován. Spermii od anti HIV negativního dárce lze

použít nejméně po 180 dnech. Dárce musí být znovu vyšetřen na anti HIV negativitu a teprve v případě opakované anti HIV negativity lze sperma užít pro umělé oplodnění. Lze tedy provádět oplodnění semenem dárce pouze v zařízení, kde je možno provádět kryokonzervace semene. Tímto se ruší pokyn ze dne 13.7. 1988, kde bylo sděleno, že lze užít spermatu od anti HIV negativního dárce, který byl týden předem vyšetřen na HIV protilátky.

Úspěšná inseminace zmrazenými spermii u žen byla možná až po objevu, že glycerol je rovněž účinné kryoprotektivum při kryokonzervaci spermii (14,18). Techniky užívané ke kryokonzervaci spermii se podle pracovišť různí. Pracoviště zabývající se touto problematikou užívají jako kryoprotektiva glycerol nebo některé jiné látky a zmrazují spermie v pejetách nebo ampulích v tekutém dusíku (52).

Snahou pracovišť zabývajících se kryokonzervací spermii je, aby vitalita spermii byla po zmražení, skladování a následném rozmražení co nejvíce podobná jejich vitalitě před zmrazením. Jen tak lze dosáhnout zvýšení procenta úspěšnosti ve všech technikách asistované reprodukce, které budou kryokonzervované spermie používat. V následujících kapitolách bude rozebrána metodika kryokonzervace spermii a srovnání dvou kryokonzervačních technik, popsána technika kryokonzervace embryí a experiment s kryokonzervací oocytů.

3. Cíl práce.

Cílem této studie bylo ověření možnosti zavedení kryokonzervace lidských gamet a embryí do klinické praxe v rámci programu asistované reprodukce. Byla sledována možnost zavedení co možná nejefektivnějšího a nejlevnějšího způsobu kryokonzervace. Testoval jsem unikátní a velmi jednoduché kryokonzervační zařízení tuzemské provenience, které by mělo nahradit značně nákladná zařízení z dovozu. Toto zařízení bylo ověřováno ve čtyřech experimentech. Dva experimenty zahrnovaly pomalou a rychlou metodu kryokonzervace lidských spermií, třetí se týkal pokusu o kryokonzervaci lidských oocytů a čtvrtý se zabýval kryokonzervací embryí.

V této práci byly využity zkušenosti a poznatky zahraničních i domácích autorů, zejména z oblasti veterinární medicíny, neboť reprodukční postupy a techniky jsou ve veterinární medicíně daleko více propracovány než v medicíně humánní.

V době, kdy díky rozvoji farmaceutického průmyslu dochází i v humánní medicíně k lepším možnostem hyperstimulace ovarií a tím i k získávání většího počtu oocytů, je zavádění kryokonzervačních technik mezi stávající metody asistované reprodukce podmínkou dalšího rozvoje léčby neplodného manželství.

Tyto pokroky ve stimulaci ovarii však mohou v některých případech vyústit až v **hyperstimulační syndrom**. Tato komplikace se může projevit ve třech stupních.

- I. stupeň - napětí v podbřišku, zvětšení ovarii do velikosti 5 x 5 cm, přírůstek na váze do 5 kg.
- II. stupeň - bolest v podbřišku, někdy gastrointestinální potíže, ovaria zvětšena do velikosti 10 x 10 cm cystického charakteru, přírůstek na váze nad 5 kg.
- III. stupeň - vyskytuje se ascites, hydrothorax, v nejtěžších případech dochází k hemokoncentraci, zvýšené viskozitě, koagulaci a trombóze. Přírůstek na váze je větší než 10 kg.

Léčba hyperstimulačního syndromu je vždy konzervativní. Podávají se kortikoidy a sleduje se velikost ovarii, aby nedošlo k jejich ruptuře. Za tím účelem provádíme někdy odlehčující punkci. U III. stupně je nezbytně nutná hospitalizace a opatření k zabránění rozvratu metabolismu. K operačnímu řešení se uchylujeme pouze tehdy, dochází-li k ruptuře ovarii a vytváří-li se hemoperitoneum (36).

S rozvojem medicinských technik v oblasti asistované reprodukce a prenatální diagnostiky se stávají stále důležitějšími také otázky etiky. V roce 1989 byl na výročním zasedání Evropské společnosti pro reprodukci a embryologii člověka (ESHRE) v Molmó, byl ustaven etický výbor, který vytvořil směrnice pro praktické postupy v asistované reprodukci a prenatální diagnostice. Výbor se omezil pouze na

klasifikování různých postupů klinických i experimentálních bez ohledu na jakýkoli zákonodárný, náboženský nebo filosofický názor. ESHRE má cíl podporovat získávání znalosti, týkajících se podmínek a procesů ve vývoji lidských jedinců, které lze z etického hlediska schválit nebo vyloučit. V praxi to znamená sestavení souboru směrnic pro jednotlivé postupy v reprodukční medicíně včetně prenatální diagnózy, které jsou z profesionálního hlediska považovány za slučitelné s korektní medicínskou praxí. Mezi doporučené techniky asistované reprodukce patří postupy, z nichž uvádím pouze ty, které mají bezprostřední vztah k této práci:

1. fertilizace in vitro a transfer embrya (IVF a ET) - zahrnuje aspiraci oocytů, jejich inseminaci spermiemi in vitro a přenos vzniklých embryí do dělohy. (112)
2. transfer gamet do vejcovodu (GIFT) - představuje zavedení obou druhů gamet do vejcovodu (95)
3. transfer zygoty do vejcovodu (ZIFT) - neboli přenos pronukleárního stadia (PROST) - jde o laparoskopický transfer zygoty obsahující dvě prvojádra do fimbriálního konce vejcovodu (134)
4. tubární transfer embrya (TET) - je obdobou ZIFT, jedná se však o transfer embrya ve stadiu rýhování do vejcovodu, buď laparoskopicky nebo transcervikálně (7, 34, 10, 45)
5. uchovávání gamet a embryí - jde o kryokonzervaci spermií, embryí eventuelně oocytů v tekutém dusíku při teplotě - 196 °C teoreticky nekonečně dlouho bez ztráty

jejich životaschopnosti. U dárců spermií závisí délka uchovávání na počtu dosažených těhotenství. Americká společnost pro fertilitu navrhuje 15 úspěšných těhotenství na dárce, ve Francii pouze 5 těhotenství na dárce (3,15). Kryokonzervaci oocytů vzhledem k možnosti vzniku chromozomálních aberací řada autorů nedoporučuje (42,29,122,50,91) Pro kryokonzervaci embryí byly doporučeny dvě metody a to:

- a) pro stadium pronukleární a raného rýhování (115)
- b) pro pozdní stadia rýhování a blastocysty (24).

Délka uchovávání kryokonzervovaných embryí se v různých zemích pohybuje od 1 do 10 let (42). Pokud se nerozhodne písemně jinak, zmrazená embrya by měla být likvidována v případě rozvodu nebo smrti některého z partnerů.

6. arteficiální inseminace spermiemi partnera - zahrnuje intrauterinní inseminaci (IUI) a přímou intraperitoneální inseminaci (DIPI) (19,13,25).
7. arteficiální inseminace spermiemi dárce - využívá kryokonzervovaných spermií dárce ve výše popsáných metodách asistované reprodukce. Mezinárodní konsensus, který by byl přijatelný různými zeměmi a náboženstvími, neexistuje. Vodítkem by měly být směrnice CECOS o použití spermií dárce (15) a směrnice WHO (4,132).

Jakákoliv rozhodnutí o zavádění metod asistované reprodukce by měla vycházet z výše uvedených postupů ESHRE, které představují návrh etických norem v oblasti reprodukční

medicíny. Tato práce z těchto norem vychází a poukazuje na možnosti zavádění kryokonzervačních technik v asistované reprodukci ve většině zdravotnických zařízení, která se touto problematikou zabývají.

4. Metodická část.

4.1. Kryokonzervační zařízení.

Ke kryokonzervaci spermií bylo použito jednoduchého modifikovaného Elsdenaova zmrazovacího přístroje. Tato modifikace je čs. patentem prof. Holého a ing. Škarka (obr.č.2). Tento přístroj se skládá z části stacionární a z části pohyblivé. Část stacionární je tvořena dvěma kovovými kruhy o průměru 145 mm, které jsou od sebe fixovány ve vzdálenosti 160 mm dvěma kovovými vzpěrami. Dolní kruhová část je vysoká 25 mm, opatřená obrubou vysokou 15 mm, která slouží k fixaci kryokonzervačního zařízení na hrdlo kontejneru s tekutým dusíkem. V této podstavě je vyfrézován kruhový otvor o průměru 90 mm, jehož průměr je shodný se světlostí hrdla kontejneru. Horní stacionární kruhová část je opatřena držákem, ve kterém se otáčí stavěcí šroub dlouhý 75 mm, na jehož konci je ozubené kolo o průměru 22 mm. Dále jsou zde vyfrézovány dva otvory. První čtyřhranný 10 x 10 mm, ve kterém se pohybuje mobilní část zařízení a druhý ledvinovitého tvaru, který umožňuje zasunutí čidla digitálního teploměru do kryokonzervačního válce. Část pohyblivá se skládá z kovového čtyřhranu širokého 10 x 10 mm a dlouhého 320 mm, který je cejchován po 10 mm, a je opatřen zuby, které zapadají do ozubeného kola stavěcího šroubu. Do tohoto čtyřhranu je zašroubován kruhový držák dlouhý 165 mm o

průměru 10 mm, který má dole závit, na který se našroubuje kryokonzervační válec.

Hlavní součástí tohoto zmrazovacího přístroje je kovový válec s pevným dnem o průměru 86 mm a délce 126 mm. Tento válec slouží ke kryokonzervaci spermíí. (Obr.č.3).

Stavěcí šroub umožňuje plynulý mechanicky řízený sestup děrovaného válce do par tekutého dusíku. Zmrazovací kovový válec je sestaven ze šesti do sebe zapadajících menších válců. První tvoří obal celého zařízení a v druhém až šestém jsou vyfrézovány drážky tak, aby se do nich daly zasunout bez obtíží zmrazovací pejety se spermii. Celkový počet drážek je 60, což umožňuje zmrazovat najednou 60 inseminačních dávek. Hloubka těchto drážek odpovídá délce pejet o objemu 0,5 ml.

Jednoduchou manipulací lze válec, sloužící ke kryokonzervaci spermíí, vyměnit za válec menší o průměru 30 mm a délce 120 mm, který se skládá ze tří do sebe zapadajících menších válců, ve kterých je vyfrézováno 16 drážek, sloužících k uložení pejet o objemu 0,25 ml, které se používají ke kryokonzervaci oocytů nebo embryí a 8 drážek pro pejety o objemu 0,5ml. K celému zařízení patří také kovová kruhová redukce, která umožňuje fixaci modifikace pro kryokonzervaci oocytů a embryí na malém kontejneru, jehož hrdlo je užší. (Obr.č.4).

Součástí tohoto zmrazovacího zařízení je také digitální teploměr a stopky se signálním zařízením. (Obr.č.5 a 6).

Uvedení zmrazovacího zařízení do funkce se provádí tak, že do jedné z pejet naplněné kryokonzervačním roztokem se vsune čidlo digitálního teploměru. Funkce tohoto přístroje je podmíněna tím, že se zmrazovací cylinder vsune do hrdla kontejneru zhruba z poloviny naplněného dusíkem a dusíkovými parami. Do drážek válce se vsunou pejety se spermatem v kryokonzervačním médiu a pomocí stavěcího šroubu se provádí ponořování válce do par tekutého dusíku tak, aby bylo dosaženo žádoucího sestupného teplotního gradientu.

Popsané kryokonzervační zařízení je velmi jednoduché, skladné, cenově celkem nenáročné a nevyžaduje žádných devizových nároků ani devizových zdrojů. Navíc je prakticky bezporuchové.

4.2. Kryokonzervační médium.

Za neúčinnější kryoprotektivum pro zmrazování a rozmrazování lidských spermií je považován glycerol v konečné koncentraci 7,5% (118,107,18). Suspendující média bývají založena na roztocích vaječného žloutku a pufru citrátu, která byla původně vyvinuta ve veterinární medicíně pro zmrazování býčích spermií. Použité kryokonzervační médium se skládalo z 10 ml čerstvého žloutku, z 62 500 U penicilinu, 60 mg streptomycinu, 1,09 g fruktózy, 1,09 g glukózy a 1,74 g dihydrátu citronanu sodného ve 100 ml destilované vody. 32,5 ml této směsi bylo smícháno se 7,5 ml sterilního glycerolu.

Tento roztok byl inaktivován při 56 °C po dobu 30 minut a doplněn 1% váhového objemu glycinem (133,49).

Ke kryokonzervaci oocytů se běžně využívá obdobných kryokonzervačních médií, která byla vyvinuta pro kryokonzervaci embryí. Jako kryoprotektivum slouží buď dimetysulfoxid (DMSO) nebo propandiol (PROH) (93).

V této práci bylo použito 1,5 M roztoku propandiolu s 0,1 M roztokem sacharózy a 20% séra. Jako ekvilibračního média bylo použito 1,5 M roztoku propandiolu s 20% séra (108,109,26,69,111,117,118,120).

Toto médium bylo také použito ke kryokonzervaci ranných stadií embryí. Pro stadia pokročilejší byl použit 1,5 M roztok glycerolu s 20% séra pro ekvilibraci a jako zmrazovací médium 1,5 M roztok glycerolu s 0,25 M roztokem sacharózy a 20% séra.

4.3.Pomalá metoda kryokonzervace spermií.

Po zkapalnění byly spermie při pokojové teplotě naředěny kryoprotektivním médiem. Pak byla tato suspenze nasáta do transparentních pejet o objemu 0,5 ml a zapečetěna. Pejety byly označeny barevnými koncovkami tak, aby bylo možné rozlišit od kterého dárce pocházejí. Pak byly pejety vloženy do kryokonzervačního zařízení a následoval řízený sestup teploty.

Pejeta se suspenzí spermií a kryoprotektivního média v poměru 1:1 byly vloženy do zmrazovacího válce a tento válec byl mechanicky ponořován do par tekutého dusíku za současného sledování teploty kryoprotektivního media v kontrolní pejetě obsahující čidlo digitálního teploměru tak, aby teplotní gradient byl - 1 °C za minutu. Tento sestup teploty probíhal až do - 5 °C, kdy byl sestup teploty zastaven a byl vyvolán seeding - umělá tvorba krystalků ledu. Seeding byl prováděn tak, že peánové kleště, které byly předtím ponořeny do nádoby s tekutým dusíkem, se dotkly pejety. Po 10 minutové inkubaci, aby indukce tvorby ledových krystalků (seeding) proběhl v celé pejetě, byl další sestup teploty 10° za minutu až do -80 °C. Pak byly pejety se suspenzí spermií a kryoprotektiva přeneseny do tekutého dusíku, tj. do teploty -196 °C (Graf č.1) a umístěny do kontejneru s tekutým dusíkem. (Obr.7).

4.4. Rychlá metoda kryokonzervace spermií.

Po zkapalnění byly spermie při pokojové teplotě naředěny kryoprotektivním médiem, pak byla tato suspenze nasáta do transparentních pejet o objemu 0,5 ml a zapečetěna. Pejety byly označeny barevnými koncovkami tak, aby bylo možno rozlišit, od kterého dárce pocházejí. Pak byly pejety vloženy do kryokonzervačního zařízení a následoval řízený sestup teploty.

Válec kryokonzervačního zařízení byl v parách tekutého dusíku podchlazen na - 5 °C a tato teplota byla kontrolována

pomocí kontrolní pejety s kryoprotektivem, ve které bylo instalováno čidlo digitálního teploměru. Při teplotě - 5 °C byly do drážek zmrazovacího válce umístěny pejety se suspenzí spermií a kryoprotektiva. Po inkubační době 10 minut byl proveden seeding a po další 10 minutové inkubaci byl proveden řízený sestup teploty do - 80 °C rychlostí 10° za minutu. (Obr.č.2). Pak byly pejety vloženy do tekutého dusíku a přeneseny do kontejneru s tekutým dusíkem. (Obr.č.8).

4.5. Získávání vzorků spermií

Ke sledování vlivu rychlé a pomalé metody kryokonzervace spermií byly používány spermie získané v rámci programu IVF. Celkem byly zpracovány vzorky od 36 dárců, přičemž od každého vzorku bylo hodnoceno po 50 spermiích čili 1800 spermií v každé metodě, celkem tedy 5400 spermií. Všechny vzorky ejakulátů odpovídaly všeobecně uznávaným kritériím darovaných spermií pro kryokonzervaci (4):

- objem ejakulátu větší než 1,5 ml
- koncentrace spermií větší než 50 mil./ml
- motilita spermií větší než 50%
- progrese spermií větší než 3 (stupnice 0 - 4)
- morfologie spermií - více jak 45% normálních spermií

4.6. Zpracování vzorků spermií

Získaný ejakulát byl po kolikvaci po kapkách naředěn výše popsaným kryokonzervačním médiem obsahujícím jako

kryoprotektivum glycerol v poměru 1:1 a to tak, že vždy bylo kapáno kryoprotektivum do ejakulátu za stálého šetrného třepání. Příprava i hodnocení spermií od jednoho dárce se děly vždy za stejných podmínek.

4.7. Příprava mikroskopického preparátu

Na podložní skličko bylo mikropipetou přeneseno 20 ul suspense spermií a přikryto krycím skličkem. Takto připravený preparát má hloubku 20-30 um, která nijak neomezuje pohyb spermií(132).

K hodnocení pohybu spermií byl použit mikroskop s temným polem Amplival Carl Zeis Jena, na jehož kondenzor byla nanесena kapka imerzního oleje a na ni připravený preparát. Byl použit objektiv zvětšující 40 x a okulár 10 x. K fotografování spermií bylo přistoupeno cca za 2 minuty od přípravy preparátu, kdy ustává proudění tekutiny pod krycím sklem.

4.8. Fotografování spermií

K objektivnímu posouzení motility spermií u jednotlivých dárců před zmražením a po rozmražení bylo využito modifikované fotografické metody s intervalovou expozicí (time - lapse exposure photographic method) (90,46).

K fotografování spermií byl použit fotoaparát značky Contax RTS II. firmy Yashica, jehož tubus je možno nasadit na adaptér mikroskopu. Jako fotografického materiálu bylo

použito kinofilmu Foma o citlivosti 23 DIN a doba expozice snímku byla 2 sekundy.

Podle koncentrace spermií v preparátu byl zvolen takový počet snímků, aby bylo možno u každého vzorku hodnotit 50 spermií (přibližně 5 snímků na jeden vzorek). Měření délky stopy spermií na jednotlivých snímcích bylo prováděno milimetrovým měřítkem na stínítku přístroje MEOFLEX RI 21 P Meopta. Z velikosti zvětšení a délky stopy spermií byla vypočítána rychlost pohybu spermií v době expozice a byla srovnávána délka stopy spermií ve vzorku stejného ejakulátu před zmražením a po rozmražení.

4. 9. Kryokonzervace oocytů.

Oocyty ke kryokonzervaci byly získány od pacientek, které před diagnostickou laparoskopii nebo laparotomií daly písemný souhlas k tomu, že v případě náhodného získání oocytů budou tyto využity k výzkumným účelům kryokonzervace.

Bylo získáno deset oocytů, které byly ekvilibrovány v roztoku 1,0 M roztoku propandiolu a s 20% séra po dobu 10 minut a potom byly přeneseny do kryokonzervačního média. Kryokonzervační médium tvořil 1,5 M roztok propandiolu s 0,1 M roztokem sacharózy a 20% séra. V tomto kryoprotektivu byly oocyty nasáty do pejetek.

Pejetky s oocyty byly vloženy do menšího válce kryokonzervačního zařízení. Ochlazování probíhalo z teploty + 20 °C na - 7 °C rychlostí 1 °C /min. Při této teplotě (- 7

°C) byl dotykovým způsobem vyvolán seeding a po 10 minutové inkubaci, při které dojde k ledové krystalizaci v celé pejetě, pokračovalo ochlazování na - 36 °C rychlostí 0,3 °C/min. Po 20 minutové ekvilibraci byly pejety přeneseny do kontejneru s tekutým dusíkem (graf č.3). V rozmezí cca 1 měsíce po zmražení byly oocyty pomalým způsobem rozmrazeny a přeneseny na dobu 10 minut do běžného kultivačního média, které je používáno pro kultivaci embryí, a které obsahovalo 1,0 M roztok sacharózy. Po důkladném promytí ve třech a čtyřech lázních čerstvého kultivačního média byly oocyty sledovány pod mikroskopem.

4. 10. Kryokonzervace embryí

Preovulační oocyty byly získány u pacientek při komplexní diagnostické laparoskopii (KDL) nebo při ultrazvukové vaginální punkci folikulů (IVF vag.). Ke kryokonzervaci jsme připravili 66 embryí v různých stádiích vývoje, od pronukleárního stádia až po stádium moruly s použitím standardní metodiky (31). Bylo použito následující obecné schéma pro kryokonzervaci:

- přenesení embryí do média s kryoprotektivem a jejich ekvilibrace v kryoprotektivním prostředí
- nasátí embrya do pejety a její zapečetění
- ochlazování embryí až k negativním teplotám

- indukce formování ledových krystalů v extracelulárním prostředí náhlým bodovým ochlazením pejety v co největší vzdálenosti od embrya
- další postupné ochlazování umožňující pokračující dehydrataci embryonálních buněk
- ochlazení ponořením do tekutého dusíku a uchování při teplotě - 196 °C
- rozmrazení
- postupné odstranění kryoprotektiva promýváním v kultivačním médiu

Jako kryoprotektiva bylo použito organických sloučenin s vysokou afinitou k molekulám vody, snižující při změně skupenství rychlost růstu ledových krystalů (22), pro časná stádia embryí PROH (54), pro stádia pokročilejší glycerol (17).

K ekvilibraci pro časná stádia embryí jsem použil 1,5 M roztok PROH s 20% séra a jako zmrazovací médium bylo použito 1,5 M roztoku PROH s 0,1 M roztokem sacharózy a 20% séra. Pro stádia pokročilejší byl použit 1,5 M roztok glycerolu s 20% séra pro ekvilibraci a jako zmrazovací médium 1,5 M roztok glycerolu s 0,25 M roztokem sacharózy a 20% séra. Ekvilibrace probíhala v ekvilibračním médiu 15 minut při pokojové teplotě. Po ekvilibraci byla embrya nasáta spolu se zmrazovacím roztokem do pejet o obsahu 0,25 ml a ochlazována z teploty + 20 °C na - 7 °C rychlostí 1 ° /min.. Při této teplotě byla provedena indukce formování ledových krystalů

(seeding). Pak pokračovalo ochlazování na $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $0,3\text{ }^{\circ}/\text{min.}$. Po 20 minutách ekvilibrace při teplotě $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla embrya přenesena do tekutého dusíku a uchovávána při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (graf.č.4). Za 1 - 3 měsíce byla embrya rozmrazena a přenesena na dobu 10 minut do kultivačního média s 1,0 M roztokem sacharózy (115,31). Po následném důkladném promytí ve 3 - 4 lázních čerstvého média byla embrya připravena buď k další kultivaci (časná stádia) nebo k transferu do dělohy (pozdní stádia).

5. Výsledky

5.1. Motilita spermií po kryokonzervaci

Pro objektivizaci vlivu nízkých teplot na kvalitu spermií bylo použito zhodnocení jejich motility před a po kryokonzervaci.

Byla porovnávána průměrná délka dráhy ve vzorku ejakulátu před zmražením (s) a rychlost spermií (v). Týž vzorek ejakulátu byl zmražen pomalou metodou a po rozmražení byla zjišťována průměrná délka dráhy spermií (s_1) a průměrná rychlost spermií (v_1). Stejný vzorek ejakulátu byl zmražen rychlou metodou a po rozmražení byla sledována průměrná délka dráhy spermií (s_2) a průměrná rychlost spermií (v_2). (graf č.5, Obr.č.9 a 10).

Maximální a minimální hodnoty s , v , s_1 , v_1 , s_2 a v_2 v jednotlivých vzorcích ejakulátu ukazuje tabulka č. 1. Bylo zjištěno, že s se pohybovalo v intervalu 0,35 - 0,66 μm a v v intervalu 0,15 - 0,33 $\mu\text{m/s}$. Pro s_1 byl tento interval 0,17 - 0,65 μm a pro v_1 0,09 - 0,33 $\mu\text{m/s}$. Hodnoty s_2 byly 0,12 - 0,45 μm a v_2 0,06 - 0,23 $\mu\text{m/s}$. Tabulka č. 2 zaznamenává průměrné hodnoty s , v , s_1 , v_1 , s_2 , v_2 . Průměrná hodnota s byla 0,38 μm a v 0,23 $\mu\text{m/s}$, s_1 0,36 μm , v_1 0,18 $\mu\text{m/s}$ a s_2 0,31 μm , v_2 0,15 $\mu\text{m/s}$.

Tyto hodnoty přenesené do sloupcového grafu (graf č. 6) ukazují, že dochází k snižování hodnot s_1 , v_1 a s_2 , v_2 , oproti hodnotám s a v . Je tedy zřejmé, že délka dráhy a rychlost spermií klesá s rychlostí kryokonzervace. Ještě přehledněji je tato skutečnost vyjádřena v grafu č. 7, který ukazuje snížení hodnot s_1 a s_2 a v_1 a v_2 proti výchozím hodnotám s a v , které bereme jako základní hodnoty. Je patrné, že s_1 klesá proti s o 5,3% a s_2 o 18,4%. V hodnotách v_1 a v_2 je situace obdobná, v_1 je nižší o 21,7% a v_2 o 34,8%. Porovnáme-li hodnoty s_1 proti s_2 a v_1 proti v_2 , dostaneme srovnání pomalé a rychlé metody kryokonzervace spermií. Rychlá metoda kryokonzervace vykazuje hodnoty s_2 a v_2 o 13,1% nižší, než pomalá metoda. Tuto skutečnost vyjadřuje graf č. 7.

Od května do prosince 1992 bylo výše popsány metodami kryokonzervace spermií připraveno celkem 195 inseminačních dávek. Heterologní intrauterinní inseminace kryokonzervovaným ejakulátem (AIUI) byly zahájeny v prosinci 1992. V tomto měsíci bylo provedeno celkem 9 AIUI, z nichž v současnosti probíhá 1 intaktní gravidita.

5.2. Stav oocytů po kryokonzervaci

Z 10 oocytů, které byly kryokonzervovány došlo u 3 oocytů k destrukci buňky vlivem porušené buněčné membrány. U zbylých 7 oocytů pozorovaných ve světelném mikroskopu, nebyla prokázána porucha morfologie buňky. (Obr. č. 11). Tyto oocyty

dosáhly původního tvaru a rozměrů buňky a v jejich případě nedošlo k ruptuře buněčné membrány. Ztráta při kryokonzervaci oocytů byla v tomto malém souboru 33,3%.

5.3. Stav embryí po kryokonzervaci

Celkem bylo kryokonzervováno 66 embryí, z toho 11 embryí v časném stádiu a 55 embryí v pozdním stádiu vývoje.

Embrya v časném stádiu vývoje byla po kryokonzervaci kultivována 20 - 26 hodin a byl sledován jejich další vývoj. Z 11 kryokonzervovaných ranných embryí se po rozmražení a následné kultivaci se 4 embrya dále nevyvíjela a zůstala na stejném stupni vývoje, jako před kryokonzervací. Zbylých 7 embryí se dále rýhovalo do 4 - 6 buněčného stádia a blastomery těchto embryí nejevily mikroskopicky zjistitelné známky patologie (114), (Obr.12).

Embrya v pozdním stádiu vývoje byla po vymytí kryoprotektiva nasáta do transferové soupravy a ihned transferována do dělohy. Od další kultivace těchto embryí bylo upuštěno vzhledem k velké náročnosti a problematickým výsledkům s laboratorní kultivací blastocyst a morul.

Od června do listopadu 1992 bylo provedeno 15 transferů po kryokonzervaci, při kterých bylo transferováno 37 embryí, z toho 5 ranných embryí, 30 blastocyst a 2 moruly.

Gravidita po embryotransferu kryokonzervovaného embrya nebyla dosud na našem pracovišti zaznamenána.

6. Diskuse

V procesu rozvoje kryokonzervace spermií je hlavním úkolem nejen zdokonalování, ale i zjednodušování jednotlivých metodik, včetně časového zkrácení celého zmrazovacího procesu na minimální dobu tak, aby tento proces mohl být bez větších nároků na čas a personál začleněn do běžné klinické praxe. S tímto úsilím samozřejmě souvisí také zjednodušování kryokonzervačních zařízení, která jsou finančně velmi náročná a navíc závislá na dovozu z devizových oblastí. Bylo prokázáno, že ke kryokonzervaci lze používat výše popsané velmi jednoduché kryokonzervační zařízení, které je modifikací Elsdanova přístroje. K jeho uvedení do provozu není potřeba nic jiného, než kontejner se standardní hladinou tekutého dusíku a dusíkových par, dále digitální teploměr s čidlem, které je umístěno v kryoprotektivním médiu zmrazovací pejety o objemu 0,5 ml typu Cassou. Vzhledem k tomu, že digitální teploměr tuzemské provenience je u nás běžně dostupný bez devizových nároků, je tento typ zařízení svou jednoduchostí, skladností i nízkými pořizovacími náklady v programu asistované reprodukce dobře využitelný také proto, že je zajištěna jeho výroba ve Výzkumném ústavu potravinářského průmyslu v Hrušovanech nad Jevišovkou. Výrobu digitálního teploměru zajišťují sklárny Kavalier.

Vlastní práce se zmrazováním spermií potvrdila skutečnost, že kombinované kryoprotektivum na bázi žloutku, glycerolu a

dalších komponent neovlivňuje při přímém styku kvalitu spermií. Vede naopak k dokonalé dehydrataci a stabilizaci buněčných membrán (133,51). Potvrdila se také zkušenost, že kryoprotektivem ošetřený ejakulát lze bez nebezpečí chladového šoku vložit přímo do teploty - 5 °C, což kryokonzervační proces značně urychlilo a zefektivnilo.

Přestože se kryokonzervační příprava gamet respektující fyzikálně chemická a biologická hlediska neustále zdokonaluje, ukazuje se, že i zde existují ještě značné rezervy. Ne všechny buňky, tedy i gamety, se v průběhu kryoprotekce a kryokonzervace a rozmrazovacího procesu chovají stejně (59,61). Řada z nich je vlivem těchto procesů zničena. Vzhledem k tomu, že kryoprotekce, tzn. pronikání kryoprotektiva do buněk, je závislá na propustnosti membrán a velikosti objemu buněk, nemusí být všechny buňky, tedy i gamety, kryoprotektivně připraveny a potom v některém z kroků celého kryokonzervačního procesu podléhají destrukci. Proto je prakticky vždy kvalita ejakulátu po rozmrazení nižší než před kryokonzervací, protože při kryokonzervaci dochází ke zničení 15 - 20% buněk.

Rozhodujícím kritériem pro úroveň přežívání a pohyblivosti spermií po kryokonzervaci je výchozí kvalita ejakulátu. Čím je tato kvalita vyšší, tím je vyšší kvalita ejakulátu po kryokonzervaci. Z tohoto důvodu a potvrzují to i dosažené výsledky, je důležité používat pro kryokonzervaci jen ejakulátů výborných kvalit, aby i po rozmrazení byla zajištěna optimální životaschopnost spermií. V každém případě

je třeba považovat celý kryokonzervační proces za nejtěžší zkoušku rezistence spermií. V jeho průběhu dochází vždy ke zhoršení kvality ejakulátu. Podle mnou získaných zkušeností se motilita spermií snižuje asi o 22 - 35% podle metody kryokonzervace, což je v souladu s údaji ve světové literatuře (28,32,6,133).

Podle všeobecně uznávaných kritérií by mělo po rozmražení přežít více jak 50% spermií, jejich motilita by měla být větší než 30% a progresivní pohyb spermií by měl být větší jak 2 (stupnice 0 - 4), (37,118,41,119). Jestliže po rozmražení vzorek ejakulátu neodpovídá těmto kritériím, měly by být pejety s tímto ejakulátem likvidovány.

Tato skutečnost je velmi závažná, neboť inseminace pacientky kryokonzervovanými spermiemi představuje dnes pro příjemkyni značné finanční náklady a pacientka má právo získat ejakulát co možná nejvyšší kvality, tak aby měla co největší naději na otěhotnění.

V případě kryokonzervace oocytů jsou výsledky udávané v literatuře málo uspokojivé. To ostatně ukazují i výsledky dosažené v experimentu, který byl součástí této práce. I když se jednalo o velmi malý soubor, je velmi pravděpodobné, že ani u většího souboru by výsledky nebyly o mnoho lepší. Bylo by rovněž zajímavé provést pokus o oplození kryokonzervovaných oocytů.

Vzhledem k tomu, že existuje riziko, že by některé chromozomální aberace mohly vzniknout v průběhu

kryokonzervačního procesu, bylo doporučeno, aby nebylo klinické využití zmrazených oocytů zatím aplikováno, dokud nedojde k jednoznačným závěrům výzkumná práce (42).

Pro zachování životaschopnosti gamet v procesu kryokonzervace je také zřejmě velmi důležitý fenomén intracelulární krystalizace v průběhu zmrazování a rozmrazování, který je závislý na stupni dehydratace buněk a na rychlosti zmrazovacího a rozmrazovacího procesu. Proces krystalizace ledu je komplikován komplexem chemických změn, které zahrnujeme pod pojem "solution effect", který vede k neúměrnému vzestupu koncentrace solí (77,78) a může významným způsobem narušit celulární funkci i strukturu gamet.

Aby bylo možné zajistit co nejobjektivnější srovnání pohyblivosti spermií před kryokonzervací a po kryokonzervaci výše popsanými metodami, bylo použito modifikované mikrofotografické metody, která umožňuje zachytit na kinofilm pohyb spermií v temném poli (46). Všichni dárci, jejichž vzorky ejakulátu byly testovány, byli z hlediska WHO normospermiky. Někteří autoři (1) uvádějí u fertálních mužů průměrnou rychlost pohybu spermií nad 25 $\mu\text{m}/\text{s}$. Toto kritérium splňovala většina testovaných dárců, přesto však vzorky ejakulátu některých dárců vykazovaly po procesu kryokonzervace a následném rozmražení výraznou alteraci pohybu. Je tedy zřejmé, že ne všechny ejakuláty jsou vhodné ke kryokonzervaci. Tuto skutečnost potvrzují i dlouholeté zkušenosti veterinární medicíny.

Kryokonzervace embryí se v současné době provádí na mnoha pracovištích jako součást programu IVF - ET. Z klinického hlediska tohoto programu je třeba řešit otázky, zda vůbec embrya zmrazovat, kolik embryí transferovat ihned a jak provést výběr embryí pro kryokonzervaci. Tato metoda má několik výhod. Umožňuje transfer embrya v přirozeném cyklu a zabraňuje tak vzniku nebezpečí, které pro úspěšnou implantaci představuje ovlivnění kvality endometria hormonálními preparáty, které se používají pro vyvolání superovulace. Další výhodou je snížení rizika mnohočetných gravidit tím, že se transferují maximálně 3 embrya v jednom cyklu a další tzv. "nadpočetná embrya" se kryokonzervují. Na druhé straně však sám proces zmrazování představuje závažný rizikový faktor pro vývoj embrya. Někteří autoři (116) doporučují provádět transfer pouze jednoho "čerstvého" embrya ve stimulovaném cyklu a ostatní kryokonzervovat a transferovat v dalších nestimulovaných cyklech. Důležitý je výběr kryokonzervační metody a vývojového stádia, ve kterém má být embryo kryokonzervováno. Většina autorů se shoduje v tom, že pro pronukleární stádia a embrya o 4 - 8 blastomerách je nejvhodnějším kryoprotektivem DMSO nebo PROH (120, 54, 100, 103, 71, 115). Poměrně dobrých výsledků je také dosahováno s používáním glycerolu jako kryoprotektiva (17).

Tato metoda se používá především pro stádia pozdní moruly a blastocysty. Velkou nevýhodou této metody je, že takto vysokého vývojového stádia dosahuje in vitro jen asi 1/4 embryí, což je pro klinickou praxi nevýhodné. Zprávy o tom,

zda délka kryokonzervace má vliv na životaschopnost embryí se různí (120,121). Za výhodnější se považuje rychlý transfer rozmrazeného embrya proto, aby byla embrya uchráněna před dalšími rizikovými faktory, které na embrya po rozmrazení a eventuelní následné kultivaci působí. Pokud se týká délky uchovávání kryokonzervovaných embryí je, v různých zemích buď legislativou nebo směrnicemi udáván interval 1 - 10 let (42).

7. Závěr a návrh na využití poznatků v praxi

Výsledky této experimentální studie ukazují na možnosti začlenění kryokonzervace lidských spermií mezi metody asistované reprodukce. Tato metoda nabývá v současnosti stále většího významu, neboť narůstá riziko možnosti přenosu AIDS a není možné tedy provádět inseminace čerstvým ejakulátem. Popsané výsledky dávají možnost výběru mezi rychlou a pomalou metodou kryokonzervace podle výchozí kvality ejakulátu. Vzhledem k tomu, že při kryokonzervaci dochází ke snížení kvality ejakulátu cca o 22% při pomalé metodě a o 35% při rychlé metodě kryokonzervace, je nutné zvolit správnou metodu kryokonzervačního procesu.

Využití modifikované mikrofotografické metody sledování pohybu spermií v temném poli, umožňuje objektivizaci využití metody.

Bylo prokázáno, že i použití velmi jednoduchého, tedy i prakticky neporuchového kryokonzervačního zařízení tuzemské provenience, plně nahradí devizově náročná zmrazovací zařízení ze zemí ES. Tímto se stává tato metoda přístupná pro většinu zdravotnických zařízení, zabývajících se touto problematikou.

Vzhledem ke zjištění, že ne všechny ejakuláty, i relativně kvalitní, jsou vhodné ke kryokonzervaci, bylo by žádoucí při vstupním vyšetření dárců spermatu provádět také testování

spermii na odolnost vůči chladu rychlou kryokonzervační metodou, která je nejnáročnější zkouškou rezistence spermii na proces kryokonzervace. Tato zkouška přinese značný praktický i ekonomický efekt, neboť dárcovství spermii není u nás čestnou, ale honorovanou záležitostí.

Kryokonzervaci oocytů nelze v souhlasu s literárními údaji zatím doporučit pro využití v klinické praxi. Lze však doporučit tuto metodu k další výzkumné práci na pracovištích, která se touto problematikou zabývají. Pokud by se podařilo prokázat, že kryokonzervace oocytů nemá vliv na vznik chromozomálních aberací, bylo by výhodné obohatit metody asistované reprodukce i o tuto technologii.

Kryokonzervace embryí je uznávanou metodou, patřící mezi metody asistované reprodukce na všech renomovaných světových pracovištích. Tato technologie byla shledána výhodnou i na našem pracovišti, neboť umožňuje uchovat tzv. nadpočetná embrya pro případ neúspěšného transferu "čerstvých embryí", do dalšího embryotransferu v nestimulovaném nebo jen mírně stimulovaném cyklu. Embrya lze kryokonzervovat v různých stádiích vývoje, počínaje pronukleárním stádiem, až po blastocystu. Domnívám se, že je výhodnější, a potvrzují to i citované literární prameny, kryokonzervovat pronukleární stádia nebo velmi časná embryonální stádia, která lze po rozmrazení před následným embryotransferem kultivovat. Tím se za 20 - 24 hod. přesvědčíme o vitalitě a schopnosti rýhování rozmrazeného embrya. O tuto zkoušku jsme v případě kryokonzervace pokročilých embryonálních stádií ochuzeni,

neboť v těchto případech se doporučuje po rozmrazení okamžitý embryotransfer.

Dalším důležitým přínosem kryokonzervace lidských gamet a embryí je možnost jejich darování ve zcela přesně indikovaných případech. K tomu je z legislativních důvodů nutný zcela pregnantně formulovaný souhlas manželů (viz příloha). Tato skutečnost dává kryokonzervaci v rámci asistované reprodukce hluboce humánní a etický význam.

8. Souhrn

8.1. V této práci byla ověřována možnost využití modifikovaného Elsdenova zmrazovacího přístroje (Holý, Škarek) s kontrolovaným sestupem teploty ke kryokonzervaci gamet a embryí.

K zajištění požadovaných teplot slouží vertikálně rozložený teplotní gradient dusíkových par, do nichž se pod kontrolou digitálního teploměru vnořují kryoprotektivně ošetřené gamety nebo embrya, uložené v plastických pejetách (Cassou).

Zařízení je konstrukčně i výrobně velmi jednoduché, je vyrobeno z tuzemských materiálů, není závislé na energetických zdrojích a je bez nároků na devizové prostředky. Pro svou jednoduchost a finanční dostupnost se dá toto zařízení použít ve většině zdravotnických zařízení.

8.2. Spermie uložené v pejetách Cassou (0,5 ml) byly zmrazovány pomalou a rychlou metodou s použitím žloutkového kryoprotektivního média s glycerolem. Při pomalé zmrazovací technice byl ejakulát ochlazován z pokojové teploty do $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při této teplotě byl proveden seeding s následným kontrolovaným sestupem teploty do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Při rychlé metodě byl ejakulát v pejetách vložen přímo do teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po 10 minutové inkubaci byl proveden seeding. Stejně jako u předchozí metody následoval řízený

sestup teploty rychlostí 10 °C/min. až do - 80 °C. Pak byly pejety zmrazené oběma metodami uloženy přímo do tekutého dusíku k dlouhodobému uchování.

8.3. Celkem bylo sledováno 108 vzorků od 36 dárců a to od každého po 1 vzorku před kryokonzervací a po 1 vzorku po pomalé a rychlé metodě kryokonzervace. V každém vzorku bylo hodnoceno 50 spermií, což znamená, že celkem bylo hodnoceno 5400 spermií.

8.4. K objektivnímu hodnocení pohybu spermií byla použita modifikovaná mikrofotografická metoda hodnocení pohybu spermií v temném poli, která umožňuje stanovit délku dráhy spermií a podle známého fyzikálního vzorce $v=s/t$ vypočítat rychlost pohybu spermií.

8.5. Bylo zjištěno, že pohyblivost spermií ve stejných vzorcích ejakulátu se proti stavu pohyblivosti před zmrazením pomalou metodou snižuje o 5,3% a o 18,4% při rychlé metodě. Také rychlost spermií je po rozmrazení vždy nižší než před kryokonzervací. Bylo prokázáno, že rychlost spermií po rozmrazení se proti rychlosti před zmrazením snižuje o 21,7% u pomalé metody a o 34,8%. Rychlá metoda kryokonzervace spermií vykazuje proti metodě pomalé snížení rychlosti spermií o 13,1%. Tyto údaje odpovídají hodnotám udávaným v literatuře.

8.6. Z uvedených výsledků vyplývá, že pohyblivost spermií se vlivem kryokonzervace snižuje o 22 - 35% v závislosti na použité metodě kryokonzervace. Bylo by vhodné při vstupním

vyšetřování spermioqramu dárců provádět také testování ejakulátu na rezistenci spermií vůči chladu rychlou metodou kryokonzervace, která je časově nenáročná a představuje test odolnosti ejakulátu vůči rychle působícímu chladu. Použití tohoto testu umožní výběr dárců, jejichž sperma je vhodné ke kryokonzervaci, což značně zefektivní celý proces. Od června do prosince 1993 bylo připraveno celkem 195 kryokonzervovaných dávek ejakulátu. AIUI byly zahájena v prosinci 1993, kdy bylo v tomto měsíci provedeno celkem 9 heterologních intrauterinních inseminací. Zatím bylo dosaženo jedné intaktní gravidity.

8.7. V rámci experimentu byla provedena kryokonzervace 10 oocytů, které byly náhodně získány v nestimulovaných cyklech od pacientek, u kterých byla provedena diagnostická laparoskopie nebo laparotomie pro jinou diagnózu, než sterilitu.

Oocyty byly po ekvilibraci v ekvilibračním médiu přeneseny do kryokonzervačního média z 1,5 M propandiolu s 0,1 M roztokem sacharózy a 20% séra a nasáty do pejetek. Ochlazování probíhalo za teploty + 20 °C na - 7 °C rychlostí 1 °C/min.. Při této teplotě byl proveden seeding a po 10 minutové inkubaci následovalo ochlazování na - 36 °C rychlostí 0,3 °C/min.. Po 20 minutové ekvilibraci byly pejety přeneseny do kontejneru s tekutým dusíkem. Oocyty byly rozmrazeny pomalou metodou a přeneseny na dobu 10 minut do běžného kultivačního média, které je používáno pro kultivaci embryí. Z 10 kryokonzervovaných oocytů došlo po rozmražení k

destrukci buněčné membrány u 3 oocytů. Ztráty po kryokonzervaci dosáhly tedy 33,3%, což je o 13 - 18% více, než uvádí literatura. Tento výsledek však může být chybou malého souboru. Údaje o možném vlivu kryokonzervace oocytů na vznik chromozomálních aberací zatím nedávají možnost využití této techniky v klinické praxi.

8.8. Ke kryokonzervaci bylo připraveno celkem 66 embryí v různých stádiích vývoje, od pronukleárního stádia až po stádium moruly s použitím standardní metodiky. Embrya byla ekvilibrována v ekvilibračním médiu 15 minut při pokojové teplotě. Pak byla přenesena do kryoprotektivního média a nasáta do pejetek. Pro časná embryonální stádia byl použit jako kryoprotektivum 1,5 M roztok PROH s 0,1 M roztokem sacharózy a 20% séra, pro stádia pokročilejší 1,5 M glycerolu s 0,25 M sacharózy a 20% séra. Embrya byla ochlazována z teploty + 20 °C na - 7 °C rychlostí 1 °C/min.. Při teplotě - 7 °C byl proveden seeding a po 10 minutách inkubace pokračovalo ochlazování na - 36 °C rychlostí 0,3 °C/min.. Po 20 minutách ekvilibrace byly pejety přeneseny do kontejneru s tekutým dusíkem. Embrya byla rozmrazována pomalou technikou a přenesena na dobu 10 minut do kultivačního média s 1,0 M roztokem sacharózy. Po důkladném promytí ve 3 - 4 lázních čerstvého média byla embrya připravena buď k další kultivaci nebo k embryotransferu.

Z 11 kryokonzervovaných ranných embryí se po rozmražení a následné kultivaci 4 embrya dále nevyvíjela, zbylých 7 embryí se dále rýhovalo do 4 - 6 buněčného stádia a blastomery

těchto embryí nejevily mikroskopicky zjistitelné známky patologie. Embrya v pozdním stádiu vývoje byla po vymytí kryoprotektiva nasáta do transferové soupravy a ihned transferována do dělohy.

Od června do listopadu 1992 bylo provedeno 15 transferů kryokonzervovaných embryí, při kterých bylo celkem transferováno 37 embryí, z toho 5 ranných embryí, 30 blastocyst a 2 moruly. Gravidita po těchto embryotransferech nebyla dosud na našem pracovišti zaznamenána.

9. Literatura

1. Aitken, R.J., Templeton, A., Schats, R., Best, F., Richardson, D., Djahanbakhch, O., Less, M.: Methods for assessing the functional capacity of human spermatozoa: their role in the selection of patients for in vitro fertilization. In: Fertilization of the human egg in vitro, USA, 1983, s. 147 - 165
2. Al-Hasani, S., Diedrich, K., van der Ven, H., Krebs, D.: Cryopreservation of human and rabbit oocytes. *Cryobiology*, 25, 1988, str. 584 - 585
3. American Fertility Society: New guidelines for the use of semen in donor insemination. *Fertil. Steril.* 46, 1986. Suppl. 2, str. 958 - 1108
4. American Fertility Society: New guidelines for the use of semen donor insemination. *Fertil. Steril.* 53, 1990, suppl. 1, str. 1 - 13
5. Asahina, E., Shimada, K., Hiasada, Y.: A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling. *Exp. Cell. Res.* 59, 1970, s. 349 - 358
6. Auger, J., Dadane, J. P.: Computerized sperm motility and application of sperm cryopreservation, *Arch. Androl.* 20, 1988, s. 103 - 112
7. Balmaceda, J. P., Gastaldi, C., Remohy, J., Borrero C., Ord, T. and Asch, R. H.: Tubal embryo transfer as a

- treatment for infertility due to male factor. Fertil. Steril. 50, 1978, str. 476 - 479
8. Bank, H., Mazur, F.: Vizualization of freezing damage. J. Cell. Biol. 57, 1973, s. 729 - 742
 9. Bank, J., Maurer, T. R.: Survival of frozen rabbit embryos. Exp. Cell Res. 89, 1974, str. 188 - 196
 10. Bauer, O., Diedrich, K., Van der Ven, H., Al-Hasani, S., Gembruch, V., Krebs, T.: Transvaginal tubal-embryo-stage transfer (TV-TEST) VI. World, Congress, In Vitro Fertilization and Alternate assisted Reproduction, Abstracts, 1989, str. 31
 11. Bilton, R. J., Moore, N. W.: In - vitro culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci. 20, 1976, str. 125 - 129
 12. Bilton, R. J.: Preservation of embryos of the large domestic species. In: Proc. of 9 th Int. Cong. Anim. Reprod. and A.I. Madrid, 1980, s. 245 - 253
 13. Bronson, R., Cooper, G., Rosenfeld, D.: Sperm antibodies: their role in infertility. Fertil. Steril. 42, 1984, str. 171 - 183
 14. Bunge, R. G., Sherman, J. K.: Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa, Nature 172, 1953, s. 767 - 768
 15. CECOS, Le Lanau, F., Lansae, J.: Antifical procreation with frozen donor semen: experience of french

- federation CECCOS. Human. Reprod. 4, 1989, str. 757 - 761
16. Clegg, J. S., Seitz, P., Hazlewood, C. F.: Cellular responses to extreme water loss: the water - replacement hypothesis. Cryobiology, 19, 1982, s. 306 - 316
 17. Cohen, J., Simons, F. R., Edwards, R. G., Fehilly, C. B., Fishel, S. B.: Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. J. Vitro Fert. Embryo Transfer 2, 1985, str. 59 - 74
 18. Critser, J. K., Huse-Benda, A. R., Aaker, D. V., Arneson, B. W., Ball, G. D.: Cryopreservation of human spermatozoa, III. The effect of cryoprotectans on motility., Fertil. Steril., 50, 1988, s. 314 - 320
 19. Cruz, R.I., Kemmanna, E., Brandeis, V. T., Becker, M., Beardsley, Y., Sheldon, R.: A prospective study of intrauterine insemination of processed sperm from men with oligoasthenospermia in superovulated women. Fertil. Steril. 46, 1986, str. 673 - 677
 20. Diedrich, K., Al-Hasani, S., van der Ven, J., Krebs, D.: Successful in-vitro fertilization of frozen - thawed rabbit and human oocytes. In Feichtinger, W., Kemeter, P. (Eds), Future aspects in Human In - Vitro fertilization. Springer Verlag, Berlin, 1987, str. 50 - 57

21. Diller, K. R.: Intracellular freezing: Effect of extracellular supercooling. *Cryobiology*, 12, 1975, s. 480 - 485
22. Doebbler, G. F.: Cryoprotective compounds. *Cryobiology*, 3. 1966, s.2 - 11.
23. Farrant, J.: Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinyl pyrrolidone and glycerol during freezing. *Nature*, 222, 1969, s. 175
24. Fehilly, C. B., Cohen, J., Simons, R. F., Fishel, S. B., Edwards, R. G.: Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: A Comparative Study. *Fertil. Steril.* 44, 1985, str. 638 - 644
25. Forrler, A., Dellenbach, P., Nisand, I., Moreau, L., Cranz, C. L., Clavert, A., Rumpler, Y.: Direct intraperitoneal insemination unexplained and cervical infertility. *Lancet*, 1986, str. 916 - 917
26. Friedler, S., Giudice, L. C., Lamb, E. J.: Cryopreservation of embryos and ova, *Fertil. Steril.* 49, 1988, s. 743 - 764.
27. Gayral, H. N.: Sterilité conjugale. In Mauvais Jarvis. P. and Sitruk - Ware. R. (eds). *Médecine de la Reproduction*. Flammarion. Médeciné - Sciences. Paris., 1986, s. 504
28. Glander, H. J., Baier, D., Haake, K. W.: Comparison of semen quality and follicular Growth between Conception and Nonconception Cydes After Arteficial Insemination

- by Donor Using Cryopreserved Semen. *Int. J. Fertil.* 33, 1988, str. 178 - 180
29. Glenister, P. H., Wood, M. J., Kirby, C., Whittingam, D. G.: Incidence of chromosome anomalies in first - cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. *Gamete res.* 16, 1987, str. 205 - 216
30. Griffiths, J. B., Cox, C. S., Beadle, D. J., Hunt, C. J., Reid, D. S.: Changes in cell size during cooling, warming and post - thawing period of the freeze - thaw cycle. *Cryobiology*, 16, 1979, s. 141 - 151
31. Hanzelka, Z., Tesařík, J., Lopatářová, M., Holý, L., Trávník, P., Sládek, M.: První zkušenosti s kryokonzervací lidských embryí, *Čs. Gynek.* 54, 1989, str. 729 - 732
32. Heath, E., Jeyendran, R. S., Perez - Pelaez, M., Sobrero, A. J.: Ultrastructural categorization of human sperm cryopreserved in glycerol and in TESTCY. *Int.J. of Androl.* 8, 1985, str. 101 - 111
33. Heise, P.: Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Mausezygoten unter Berücksichtigung der Aquilibrationsdauer und hoher Einfrierge schwindigkeiten. *Diss. Tierärztliche Hochschule, Hannover*, 1979
34. Henriksen, T., Abyholm, T., Tanbo, T., Magnus, O.: Pregnancies after intrafallopian transfer of embryos.

J. In Vitro Fertil. Amer. Transf., 5, 1988, str. 296 - 298

35. Heyman, Y., Chesne, P.: Freezing bovine embryos: Survival after cervical transfer of one half, one or two blastocysts frozen in traws. Theriogenology, 21, 1, 1984, s. 240
36. Horský, J., Presl, J.: Gynekologická endokrinologie. Avicenum, Praha, 1978, str. 443 - 444
37. Hummel, W. P., Talbert, L. M.: Current management of a donor insemination program. Fertil. Steril. 51D, 1989, str. 919 - 930
38. Hunter, J., Bernard, A., Fuller, B., Shaw, R.: Investigation of glycerol and DMSO as cryoprotectants for unfertilized murine and human oocytes: Fertilization and development following fertilization. Cryobiology, 28, 1991, in press
39. Chen, C.: Pregnancy after human oocyte cryopreservation, Lancet, 1986, str. 884 - 886
40. Chupin, D., Florin, B., Procureur, R.: Comparison of two methods for one step in straw thawing and direct transfer of cattle blastocyst. Theriogenology, 21, 1984, s. 445 - 460
41. Iddenden, D. A., Sallam, J. C., Collins, W. P.: A prospective randomised study comparing fresh semen and cryopreserved semen for artificial insemination by donor. Int. J. Fert. 30, 1985, str. 54 - 56

42. Interim Licensing Authority: The 5 th Report of the ILA., London, UK, 1990.
43. Jackowski, S., C.: Physiological differences between fertilized and unfertilized mouse ova, glycerol permeability nad freezing sensitivity. Knoxville, Univ. Ph. D., 1977
44. Jackowski, S. C., Leibo, S. P., Mazur, P.: Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. J. Exp. Zool., 212, 1980, s. 329 - 341
45. Jansen, R. P. S., Anderson, J.C., Suterland, P. D.: Non operative embryo transfer to the fallopian tube, N. Eng. J. Med. 319, 1988, str. 288 - 291
46. Jirásková, D., Tesařík, J., Trávník, P.: Jednoduchá mikrofotografická metoda pro objektivní hodnocení pohybu spermií, Čs. Gynek., 54, 1989, s. 416 - 423
47. Jondet, M., Dominique, S., Scholler, R.: Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. Cryobiology, 21, 1984, s. 192 -199
48. Kasai, j M., Niwa, K., Iritani, A.: Survival of mouse embryos frozen andthawed rapidly. J. Reprod. Fertil., 59, 1980, s. 51 - 56
49. Katayama, K. P., Strehlik, E., Roesler, M., Jeyendran, R. S., Holmgren, W. J., Zaneveldr, L. J. D.: Treatment of human spermatozoa with an egg yolk medium can enhance the outcome of in vitro fertilization. Fertil. Steril., 52, 1989, s. 1077 - 1079

50. Kola, I., Kirby, C. J., Shaw, J., Davey, A., Trounson, A.:
Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid
zygotes and malformed fetuses. *Teratology*, 29, 1988,
str. 467 - 474
51. Kolossa, M., Seibert, H.: A chemically "defined"
diluent for cryopreservation of bovine spermatozoa.
Andrologia, 22, 1990, s. 445 - 454
52. Kremer, J., Dijkhuis, J. R. H., and Jager, S.: A
Simplified Method for Freezing and Storage of Human
Semen, *Fertil. Steril.*, 47, 1987, s. 838 - 842
53. Kusters, G.: Tieffrierversuche mit Rinderembryonen unter
besonderer Berücksichtigung der
Ausverdunonungsmethoden. Diss. Hannover, Tierärztliche
Hochschule, 1983
54. Lassalle, B., Testart, J., Renard, J. P.: Human embryo
factures that influence the succes of cryopreservation
whit the use of 1,2 - propanediol. *Fertil. Steril.*
1985, str. 645 - 651
55. Lehn-Jensen, H., Greve, T.: Low temperature preservation
of cattle blastocyst. *Theriogenology*, 9, 1978, s. 313 -
321
56. Lehn-Jensen H.: Bovine egg transplantation: preservation
of embryos. *Nord. Veter. Med.* 1980, s. 523 - 532
57. Lehn-Jensen, H., Rall, W. F.: Cryomicroscopie
observations of cattle embryos during freezing and
thawing. *Theriogenology*, 19, 1983, s. 263 - 277

58. Lehn-Jensen, H.: Deep freezing of cattle embryos. In 10th Int. Congr. Reprod. and I.I., Illinois, 4, No. II-I-II-12, 1984
59. Leibo, S. P., Mazur, P., Jackowski, S. C.: Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell. Res.*, 89, 1974, s. 79 - 88
60. Leibo, S. P., McGrath, J. J., Cravalho, E. G.: Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse as a function of cooling rate. *Cryobiology*, 12, 1975, s. 579
61. Leibo, S. P.: Sensitivity of mouse embryos to freezing and thawing. In: Muhlbock, O. (Hrsg): Basic aspects of freeze preservation of mouse strains, 1976
62. Leibo, S. P.: Preservation of mammalian cells and embryos by freezing. In: Simatos, D., Stung, D. M., Ture, J. M., (Hrsg): *Cryobiology, ensem.*, Paris, 1977, s. 311 - 334
63. Leibo, S. P., Mazur, P.: Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: *Methods in mammalian Reproduction*. J. C. Daniel Jr., ed. Academic Press, New York, 1978, s. 179 - 201
64. Leibo, S. P.: Introduction to embryo freezing in: Zeilmaker, G. H. (hrsg): *Frozen storage of laboratory animals*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1981, s. 1 - 19

65. Leibo, S. P.: A one step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21, 1984, s. 767 - 790
66. Leibo, S. P.: Field trial of one step diluted frozen-thawed bovine embryos: an update. *Theriogenology*, 23, 1, 1985, s. 201
67. Leibo, S. P.: Cryopreservation of embryos. 11 th Int. Congr. on Anim. Rep. and A. I., Dublin, Irland, 1, 1988, s. 473
68. Leridon, H.: Sterilité hyperfertilité et infécondité en France. *Population* 4/5, 1982, s. 805 - 836
69. Liehman, P., Jiřík, S., Klír, P.: Pregnancy rate after transfer of vitrified bovine embryos. Trough the oocyte to the embryo, 4. francouzsko-československá konference, květen 1990, Praha
70. Lovelock, J. E.: The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochem. Biophys. acta*, 10, 1953, s. 414-426.
71. Mandelbaum, J., Junca, A. M., Plachot, M., Alnot, M. O., Salat-Baroux, J., Alvarez, S., Tibi, C., Cohen, J., Debache, C., Tesquier, L.: Cryopreservation of human embryos and oocytes, *Human. Reprod.*, 3, 1988, s. 117 - 119.
72. Massip, A., Van der Zwalm, P., Hanzen, C., Ectors, F.: Fast freezing of cow embryos in french straw with an

automatic program. *Theriogenology*, 18, 1982, s. 325 - 332

73. Massip, A., Van der Zwalmen, P., Ectors, F.: Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27, 1, 1987, s. 69 - 79
74. Massip, A., Van der Zwalmen, P., Hanzen, C., Ectors, F.: Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.*, 19, 1989, s. 117 - 129
75. Maurer, R.: Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. *Theriogenology*, 9, 1978, s. 45 - 68
76. Mazur, P.: Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and likelihood of intracellular freezing. *J. General. Physiolog.*, 47, 1963, s. 347 - 369
77. Mazur, P.: Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 168, 1970, s. 939 - 949
78. Mazur, P., Leibo, S. p., Miller, R. H.: Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures. *J. Memb. Biol.*, 15, 1974, s. 107 - 136
79. Mazur, P., Miller, R. H.: Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2 M solutions at 0 or 20 °C. *Cryobiology*, 13, 1976, s. 507 - 522
80. Mazur, P.: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14, 1977, s. 251 - 272

81. Mazur, P.: Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos, *Oric*, 9 th. Int. Congr. Anim. Reprod. and A. I., Madrid, 1, 1980, s. 99 - 114
82. McGann, L. E.: Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, 15, 1978, s. 382 - 390
83. Meryman, H. T.: Mechanism of freezing in living cells and tissues. *Science*, 124, 1956, s. 515 - 521
84. Meryman, H. T.: Modified modul for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature*, (London) 218, 1968, s. 333 - 336
85. Meryman, H. T.: Freezing injury and its prevention in living cells. *Annual Review of Biophysicas and Bioengiennering*, Vol. 3, Palo Alto, 1974, s. 341 - 363
86. Meryman, H. T., Williams, R. J., Douglas, M. S. J.: Freezing injury from "Solutin Effect" and its prevention by natural or ortifictal cryoprotection. *Cryobiology*, 14, 1977, s. 287 - 302
87. Mohr, L. R., Trounson A. O.: Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Repr.*, 25, 1981, s. 1009 - 1025
88. Moore, M. W., Bilton, R. J.: Frozen storage of embryos of farm animals: Progress and implications. In: Elliot, K., Whealan, J. (Hrsg): *The freezing of mammalian embryos*. Amsterdam, Elsevier, 1977, s. 203 - 220

89. Nelson, F., Nelson, L. D.: Cryopreservation of 7 to 9 day bovine embryos. *Theriogenology*, 29, 1, 1988, s. 281
90. Overstreet, J. W., Katz, D. F., Hanson, F. W., Fonseca, J. R.: A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.* 31, 1979, s. 162 - 172
91. Parks, J. E., Ruffing, N. A.: Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37, 1992, str. 59 - 73
92. Pavel, G.: Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Rinderembryonen in One-Step-Verfahren unter Verwendung eines Kryostaten, Diss. Hannover, Tier-ärztliche Hochschule, 1985.
93. Pensis, M., Loumaye, E., Psalti, I.: Screening of conditions for rapid freezing of human oocytes: preliminary study toward their cryopreservation, *Fertil. Steril.* 52, 1989, s. 787 - 794.
94. Pettit, V. H.: Commercial freezing of bovine embryos in glass ampulls. *Theriogenology*, 23, 1985, s. 13 - 16
95. Pilka, L., Tesařík, J., Dvořák, M., Trávník, P., Wallik, V.: Narození dítěte po přenosu krátkodobě kultivovaného oocytu do vejcovodu. *Čs. Gynek.* 48, 1983, str. 324 - 326
96. Rall, W. F., Farrant, J.: Slow warming injury to mouse embryos: dissociation between the formation of

- intracellular ice and injury, *Cryobiology*, 16, 1979, s. 589
97. Rall, W. P.: The role of intracellular ice in the slow warming injury of mouse embryos. In: Zeilmater, G. H. (Hrsg): *Frozen storage of laboratory animals*. Gustav Fischer Verlage, Stuttgart, 1981, s. 33 - 44
98. Rall, W. F., Czlonkowska, M., Polge, C.:
Cryopreservation of day 4 mouse embryos by the methanol. *Cryobiology*, 20, 1983, s. 742
99. Rall, W. F., Fahy, G. M.: Vitrification A new approach to embryo cryopreservation. *Theriogenology*, 23, 1985, s. 220
100. Renard, J. P., Heyman, V., Ozil, J. P.: Freezing bovine blastocysts with 1,2 - propanediol as cryoprotectant. *Theriogenology* 15, 1981, str. 113
101. Renard, J. P., Heyman, Y., Ozil, J. P.: Congélation de l'embryon bovin. Une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryon conditionnés une seule fois en paillettes. *Ann. Méd. Vét.*, 126, 1982, s. 23 - 32
102. Renard, J. P., Heyman, Y., Leymonie, P., Plat, J. P.:
Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19, 1, 1983, s. 145
103. Renard, J. P., Babinet, C.: High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic

- straws with 1,2 - propanediol as cryoprotectant. J. Exp. Zool. 230, 1984, str. 434 - 448
104. Rohloff, D., Grund, S.: Kryophysikalische Aspekte bei der Spermatiefgefrierung, In? schiren, C., Semm, K., (Hrsg): Fortschritte der Fertilitatsforschung 12. Kongressbericht Rothenburg o.d.T. Verlag Grosse, Berlin, 1983, s. 594 - 599
105. Scheiwe, M. W., Rau, G.: Biokaltetechnik: Verfahren der Gefrierkonservierung in der Medizin. Chem. Ing. techn., 53, 10, 1981, s. 787 - 797
106. Schneider, U., Mazur, P.: Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. Theriogenology, 21, 1984, s. 68 - 79
107. Schoysman, R., Schoysman - Deboeck. A., Van Roosendaal, E., Grijp, L., Segal - Bertin, G., Van der Zwalmen, P.: Cryopreservation of sperm and its clinical application. In: Asch, R. H., Balmaceda, J. P., Johnston, I. (eds) "Gamete Physiology" Serono Symposia, USA, 1990, s. 199 - 208
108. Schubert, H.: Tiefgefrierersuche mit Rinderembryonen zur methodischem Verbesserung der Kryoprotektion, der Ausverdünnung und des Auftauvorganges. Diss. Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1984

109. Schwarz, G. J., Diller, K. R.: Osmotic response of individual cells derring freezing. *Cryobiology*, 20, 1983, s. 61 - 77
110. Siebzehnuebl, E. R., Todorow, S., van Uem, J., Koch, R., Wildt, L., lang, N.: Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol, *Human Reprod.*, 4, 1984, s. 312 - 317.
111. Siebzehnruhl, E.R.: Cryopreservation of gametes and cleavage stage embryos. *Human Repord.*, 4, 1989, s. 105 - 110
112. Steptoe, P. C., Edwards, R. G.: Birth after the reimplantation of human embryo. *Lancet* II. 1978, str. 366
113. Takeda, T., Eldsen, R. P., Seidel, Jr., G. E.: Survical of cryopreserved bovine embryos cooled at 0,5 or 1 °C/minute. *Theriogenology*, 23, 1, 1985, s. 232
114. Tesařík, J., Hanzelka, Z., Trávník, P.: Vývojová způsobilost lidských embryí po kryokonzervaci ve stádiu jednobuněčné zygoty. *Čs. Gynek.* 54, 1989, str. 740 - 747
115. Testart, J., Lassall, B., Belaisch - Allart, J., Hazoud, A., Forman, R., Rainhorn, J. D., Frydman, R.: High pregnancy rate after earty human embryo freezing. *Fertil. Steril.* 46, 1986, str. 268 - 272

116. Testart, J., Lassall, B., Belaisch - Allart, J., Formna, R., Hazoud, A., Volante, M., Frydman, R.: Human embryo viability related to freezing and thawing procedures. Amer. J. Obstet. Gynecol. 157, 1987, str. 168 - 171
117. Trounson, A. O., Brand, A., Aarts, M. H.: Non-surgical transfer of deep-frozen bovine embryo. Theriogenology, 10, 1978
118. Trounson, A. O., Mahadevan, M., Wood, J., Lenton, J. F.: Studies on the deep freezing and artificial insemination of human semen. In: Richardson, D., Joyce, D., Symonds, M (Eds). "Frozen Human Semen". Roy, Coll. Obstet. Gynaecol. London, UK., 1979, s. 173 - 185
119. Trounson, A. O., Matthews, C. D., Kovacs, G. T., Spiers, A., Steingrad, S. J., Saunders, D. M., Jones, W. R., Fuller, S.: Artificial insemination by frozen donor semen: result of multicentre, Australian experience. Int. J. Androl. 4, 1981, str. 227 - 232
120. Trounson, A., Mohr, L.: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature, 305, 1983, s. 707-709.
121. Trounson, A.: Preservation of human eggs and embryos. Fertil. Steril., 46, 1986, s. 1 - 12.
122. Trounson, A., Kirby, C.: Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethyl sulfoxide. Fertil. Steril., 52, 1989, s. 778 - 786.

123. Van Uem, J. F. H. M., Siebzehrubel, E. R., Schuh, B., Koch, R., Trounson, S., Lang, N.: Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet*, 1987, str. 752 - 753
124. Whittingham, D. G., Leibo, S. P., Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to - 196 °C and - 269 °C. *Science* 178, 1972, str. 411 - 414
125. Whittingham, D. G.: Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.* 43, 1975, str. 575 - 578
126. Whittingham, D. G.: Some factors effecting embryo storage in laboratory animals. In: Elliot, K., Whealam, J. (Hrsg): *The freezing of mammalian embryos*. Amsterdam, Elsevier, 1977, s. 97 - 110
127. Whittingham, D. G.: Viability assays. In: Zeilmaker, G. H. (Hrsg): *Frozen storage of laboratory animals*. Verlag Fischer, Stuttgart, New York, 1981, s. 95 - 99
128. Willadsen, S. H., Polge, C., Rowson, L. E. A., Moor, R. M.: Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 46, 1976, s. 151 - 154
129. Willadsen, S. M.: Factors effecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In: Elliot, K., Whealan, J. (Hrsg): *The freezing of mammalian embryos*. Amsterdam, Elsevier, 1977, s. 175 - 198

130. Williams, T. J., Johnson, S. E.: The relationship between cell injury and osmotic volume reduction, II. Red cell lysis correlates with cell volume rather than intracellular salt concentration. *Cryobiology*, 17, 1980, s. 530 - 539
131. Wilmut, I.: The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Live sei.*, 11, 1972, s. 1071 - 1079
132. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 1987
133. Yavetz, H., Yoger, L., Homonnai, Z., Paz, G.: Prerequisites for succesful human sperm cryobanking: Sperm quality and prefreezing holding time, *Fertil, Steril.*, 55, 1991, s. 812 -816
134. Yovich, J. L., Blackledge, D. G., Richardson, P. A., Matson, P. L., Turner, S. R., Draper, R.: Pregnancies following pronuclear stage tubal transfer: *Fertil. Steril.* 48, 1987, str. 851 - 857

10. Přílohy

Annexe 1

Bilan médical chez les donneurs de gamètes

Ce bilan médical complet est réalisé dans le double but d'éviter le risque de transmission d'une affection grave pour la mère (risque infectieux) ou pour l'enfant (risque génétique).

Il doit comporter:

1. Pour les donneurs de gamètes (sperme ou ovocytes)
 - une évaluation du risque infectieux reposant sur l'étude des antécédents médicaux et chirurgicaux du donneur et sur l'examen clinique, accompagné d'examens biologiques:
 - a) des examens sérologiques systématiques (sypillis, hépatite, HIV ...).
 - b) pour le sperme, des spermocultures permettant la recherche de germes pathogènes.

Un autoquestionnaire orienté vers les facteurs de risque du SIDA est remis au donneur: si ce questionnaire est positif, le sperme est mis en quarantaine et une deuxième sérologie HIV est réalisée six mois après premier don.

- une évaluation du risque génétique qui repose sur l'enquête génétique ainsi que le caryotype permettent de rechercher les facteurs de risque familiaux. Le donneur est alors accepté ou refusé en tenant compte de ces informations. L'avis d'un expert généticien peut être sollicité.

2. Pour les donneurs d'embryos

Les examens sus-cités seront systématiquement réalisés chez les deux membres du couple géniteur.

Annexe 2

Congélation d'embryons

Madame, Monsieur,

La tentative de Fécondation in Vitro dont vous avez accepté le projet en accord avec l'équipe médicale du Centre peut aboutir à la, constitution d'un certain nombre d'embryons.

Nul ne sait à l'avance le nombre d'embryons transférables qui sera obtenu à partir du nombre d'ovocytes recueillis. Le pourcentage de chances de grossesses croît avec le nombre d'embryons transférés mais le risque de grossesse multiple également.

Notre attitude vise à vous assurer un maximum de chances de réussite sans prendre le risque majeur de grossesse multiple (trois foetus, voire plus) ce qui pose de sérieux problèmes médicaux. La décision du nombre d'embryons à transférer tient compte de l'étude des facteurs de risque des grossesses multiples propres à chaque couple. Il est recommandé que le nombre d'embryons se limite à trois. Exceptionnellement, ce nombre peut être porté à quatre, voire cinq dans des indications particulières (difficultés de nidation).

Certains embryons peuvent bénéficier de la congélation et être pour un transfert ultérieur se le premier transfert

d'embryons s'avérait négatif. La congélation d'embryons est actuellement largement pratiquée en France. Les embryons éventuellement cryopréservés seront conservés au Centre.....

Votre accord est indispensable à sa réalisation car il engage votre responsabilité. En effet, selon l'avis formulé par le Comité Consultatif National d'Ethique le transfert des embryons congelés doit s'effectuer dans un court laps de temps succédant au prélèvement ovocytaire. En l'absence de grossesse, le transfert des embryons congelés devra s'effectuer dans les six mois suivant la congélation et avant toute nouvelle tentative de FIV. Ce transfert ne pourra avoir lieu qu'après la demande conjointe et renouvelée des deux membres du couple et de l'équipe biomédicale.

Si le premier transfert aboutit à une grossesse, la conservation des embryons sera assurée automatiquement pendant les douze mois suivant la naissance de votre enfant. Tout délais supplémentaire fera l'objet d'un accord renouvelé du couple et de l'équipe médicale, j il est recommandé qu'en tout état de cause, la congélation des embryons n'excède pas une durée de trois ans. La cryopréservation embryonnaire est un acte coté à la nomenclature de la Sécurité Sociale et fait l'objet d'un recouvrement dont le montant vous sera adressé annuellement par l'administration dont dépend le Centre.

Madame Monsieur

Domiciliés

- acceptent la congélation des embryons non transférés
- refusent la congélation des embryons non transférés

Ultérieurement si vous vous trouvez dans l'impossibilité d'envisager la restitution des embryons congelés ou en cas de refus de votre part, vous aurez la possibilité de choisir entre trois possibilités:

- faire un don anonyme et non rémunéré des embryons à un couple stérile
- demander la destruction des embryons congelés
- accepter le principe d'une recherche scientifique en conformité avec les avis du Comité Consultatif National d'Ethique avant que les embryons ne soient détruits.

Le moment venu, votre avis sera sollicité sur ce choix et devra être confirmé par écrit par les deux partenaires du couple.

Les soussignés s'engagent à accepter l'ensemble des termes de cette proposition. En cas de difficultés ou de litiges, une solution sera recherchée entre les deux membres du couple, l'équipe biomédicale et le Comité d'Ethique compétent.

Date:

Signatures de Monsieur et Madame:

précédées de la mention "LU ET APPROUVE"

Annexe 3

Don d'ovocyte (couple receveur)

Nous avons spontanément demandé au Centre de Fécondation in Vitro la réalisation d'inséminations avec le sperme de Monsieurdes ovocytes donnés par une tierce personne.

Cette décision a été prise librement après que nous ayons été pleinement informés que le don est:

- volontaire
- gratuit
- anonyme.

Le don est basé sur un appariement des caractères physiques, après une enquête visant à éviter la transmission de tares génétiques graves ou des maladies infectieuses.

Ces conditions assurent une égalisation des chances des couples receveurs, du fait de la répartition des ovocytes de la donneuse.

A.....

Le.....

Monsieur Madame

Nom: Nom:

Prénom:

Nom de jeune fille:

Signature:

Prénom:

Signature:

Annexe 4

Don d'ovocyte (donneuse)

Je soussignée Madamecertifie avoir été parfaitement informée de la procédure du don d'ovocytes, à savoir:

- gratuité
- volontariat
- anonymat
- appariement des caractères physiques
- égalisation des chances des couples receveurs.

J'accepte l'intervention chirurgicale permettant le recueil d'ovocytes qui seront donnés anonymement à une femme souffrant de stérilité. J'ai été informée de son déroulement de ses contraintes.

Date:

Signature:

Annexe 5

**FEDERATION FRANCAISE DES CENTRES D'ETUDE ET DE
CONSERVATION DES OEUFS ET DU SPERME HUMAINS**

CECOS DE

Demande d'autoconservation de sperme

Nom:

Prenom:

Date et lieu de naissance:

Adresse precise (tout changement d'adresse doit être
signalé):

De securite sociale:

Conditions:

1. La demande de conservation du sperme est strictement
personnelle
2. Le CECOS effectue la congélation et assure la
conservation du sperme pour une durée d'un an
renouvelable
3. Ces actes, cotés la nomenclature de la Sécurité Sociale,
feront l'objet d'un recouvrement auprès du bénéficiaire
de l'autoconservation. Les sommes versées au CECOS

pourront faire l'objet d'un remboursement par la
Sécurité Sociale sous d'une demande d'entente préalable.

4. Le sperme conservé ne sera remis qu'au déposant présent
et consentant.
5. Le CECOS ne peut garantir la qualité du pouvoir
fécondant du sperme conservé.
6. L'intervention du CECOS cesse dès la remise de chaque
dose.
7. Sur demande du déposant ou à l'issue du délai de
conservation, le sperme sera détruit sauf accord écrit
autorisant l'utilisation à fin de don ou de recherche.
8. Numéro d'identification des palettes:

Fait à:

Le:

Signature:

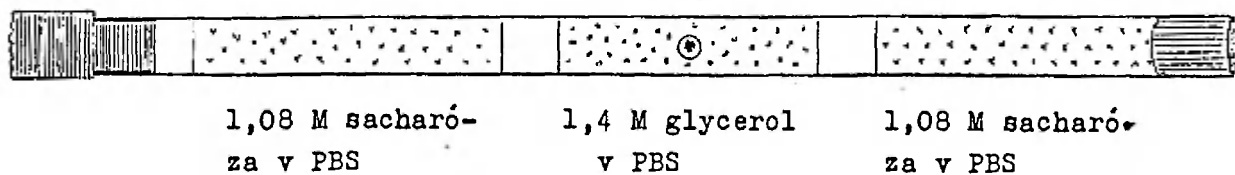
Pour le CECOS:

Obrázek číslo 1

Adjustace embrya a ředícího roztoku

pro ONE - step metodu

(LEIBO 1982, 1984)



Obrázek číslo 2



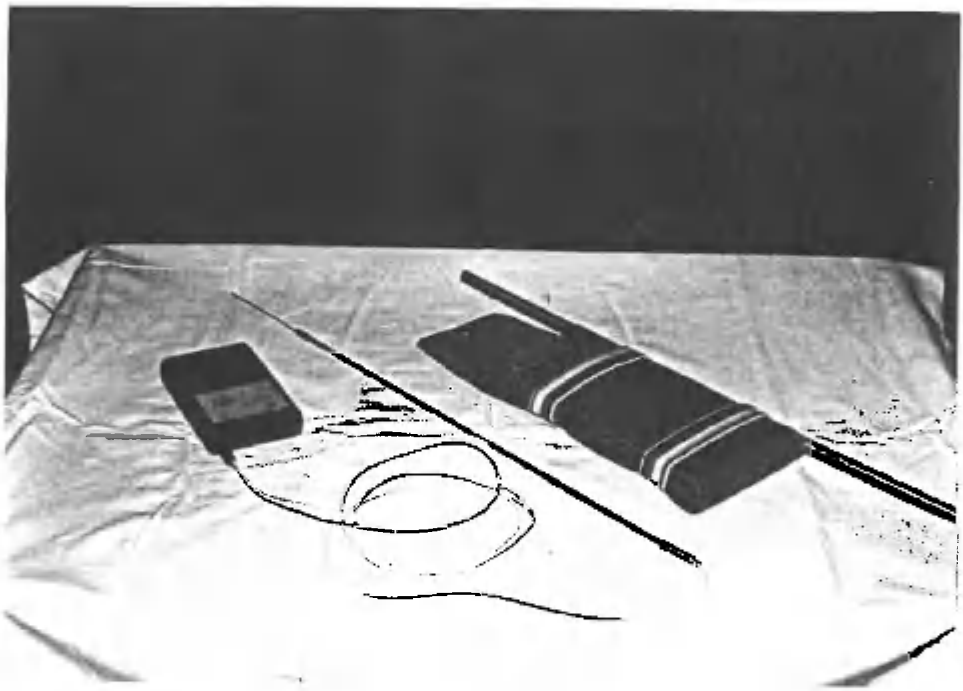
Obrázek číslo 3



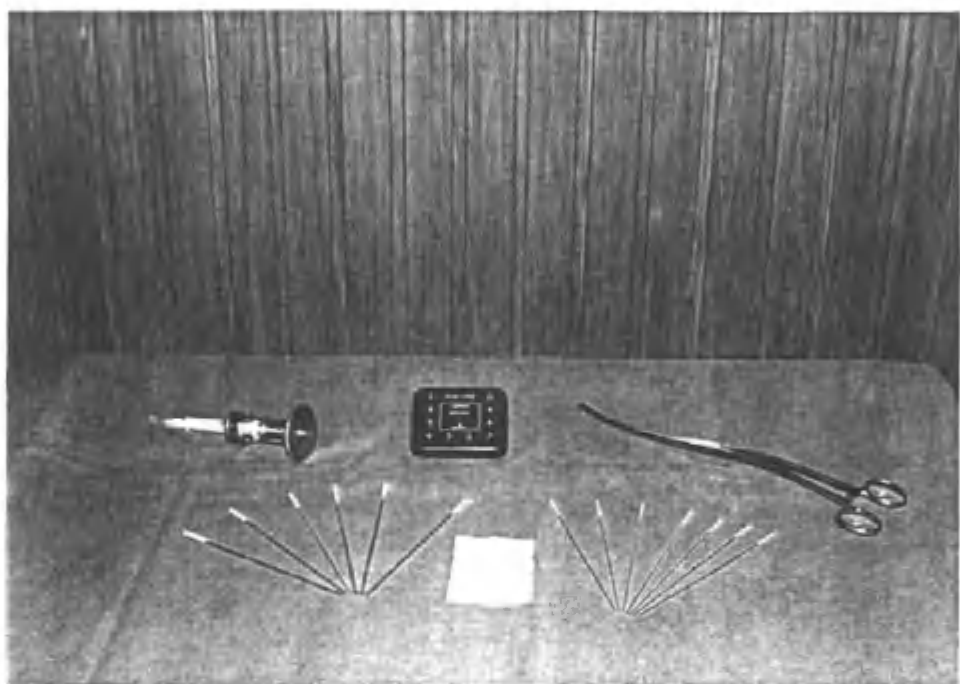
Obrázek číslo 4



Obrázek číslo 5



Obrázek číslo 6

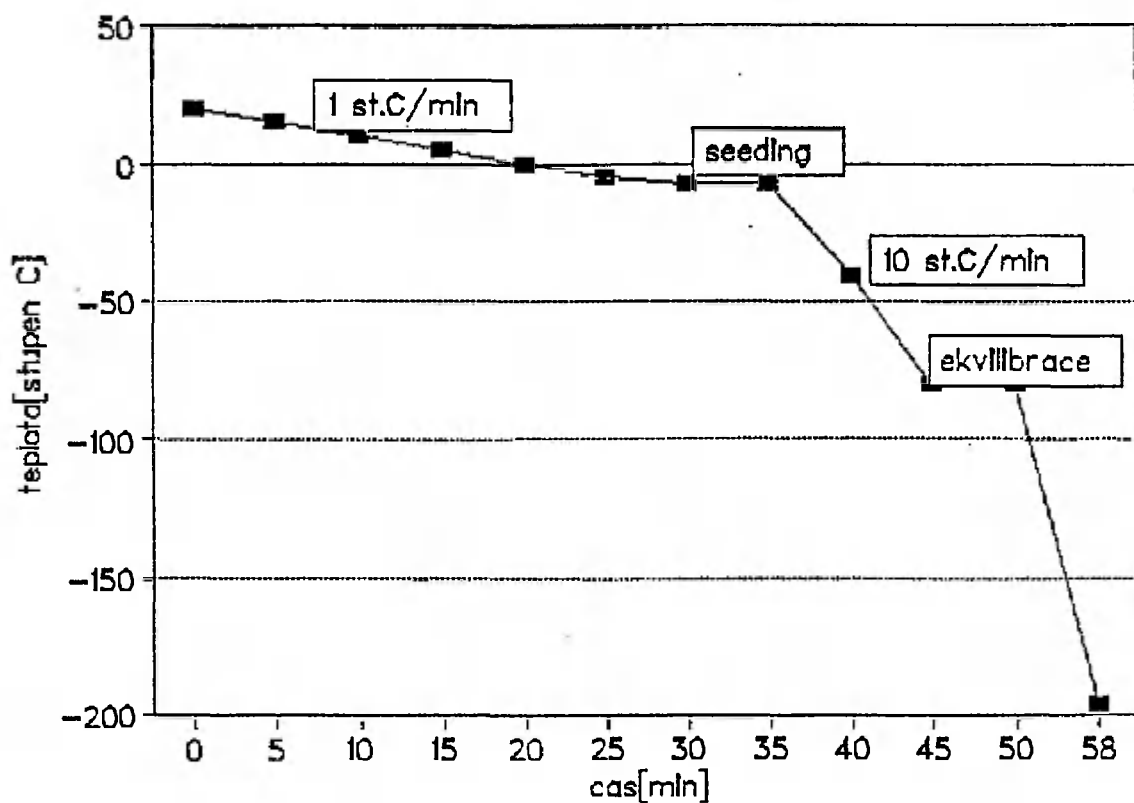


Teplovní gradient kryokonzervace spermií

(pomalá metoda - graf č.1)

čas (min)	teplota (°C)
0	20
5	15
10	10
15	5
20	0
25	-5
30	-7
35	-7
40	-40
45	-80
50	-80
58	-196

Teplotní gradient kryokonzervace spermii
(pomalá metoda - graf č.1)



Obrázek číslo 7

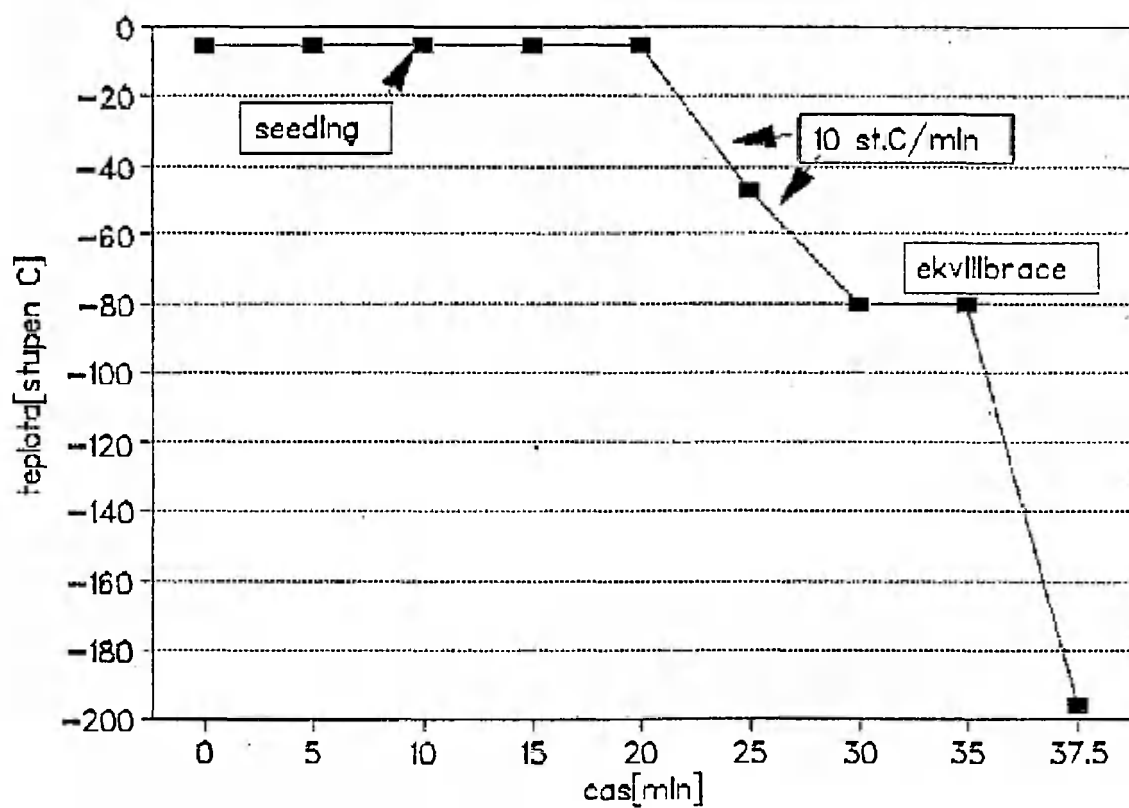


Teplotní gradient kryokonzervace spermií

(rychlá metoda - graf č.2)

čas (min)	teplota (°C)
0	-5
5	-5
10	-5
15	-5
20	-5
25	-47
30	-80
35	-80
37,5	-196

Teplovní gradient kryokonzervace spermií (rychlá metoda - graf č.2)



Obrázek číslo 8

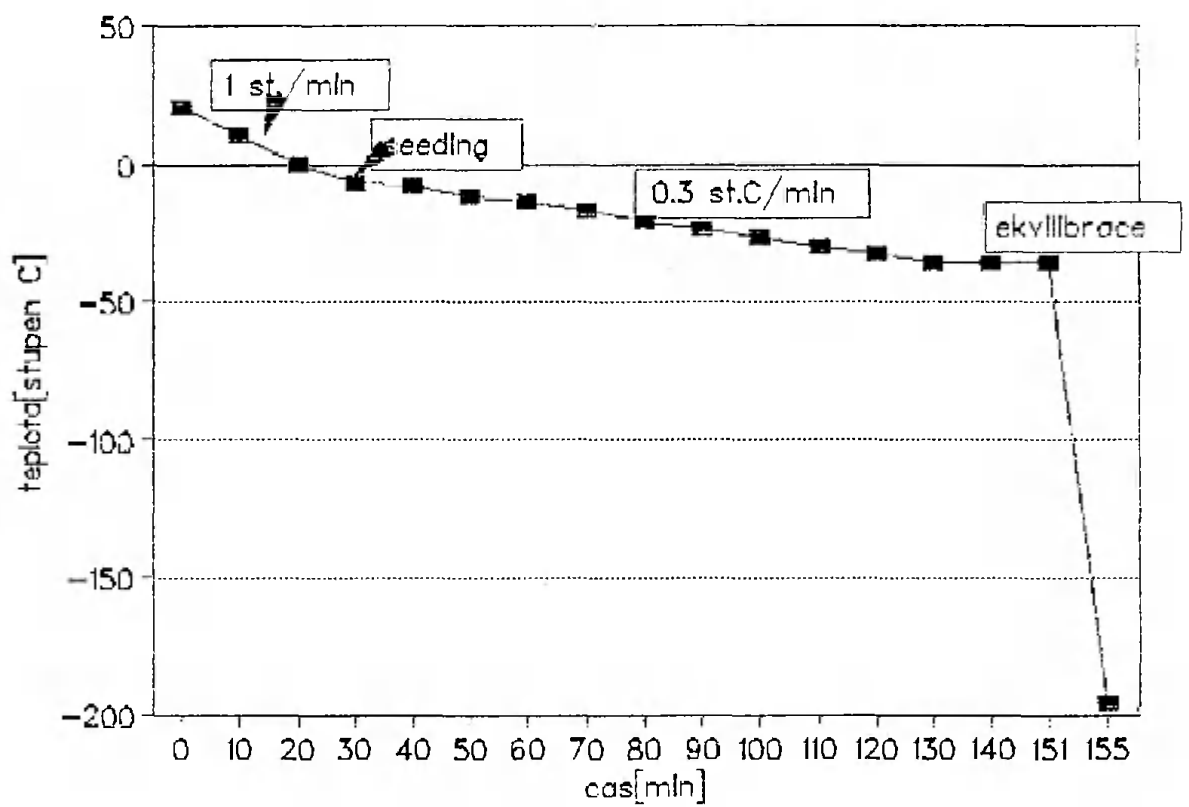


Teplovní gradient kryokonzervace oocytu

(graf č.3)

čas (min)	teplota (°C)
0	20
10	10
20	0
30	-7
40	-8
50	-12
60	-14
70	-17
80	-21
90	-24
100	-27
110	-30
120	-33
130	-36
140	-36
151	-36
155	-196

Teplotní gradient kryokonzervace oocytu (graf č.3)

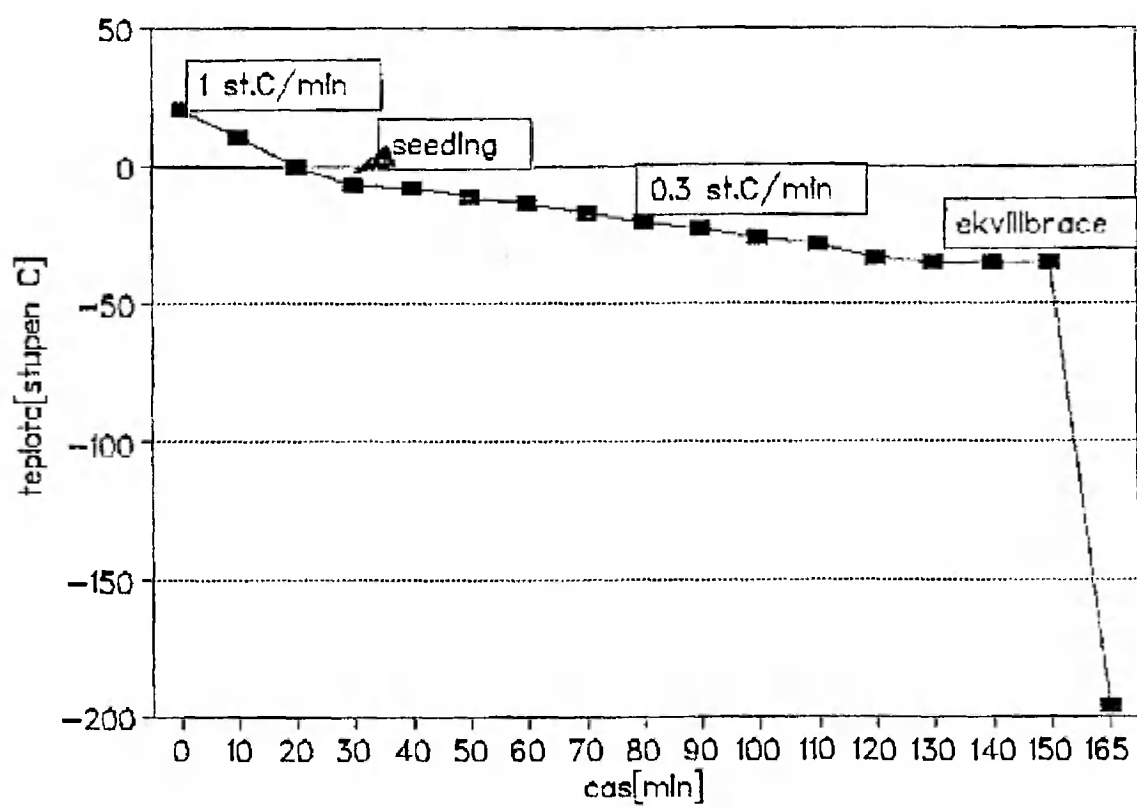


Teplovní gradient kryokonzervace embryí

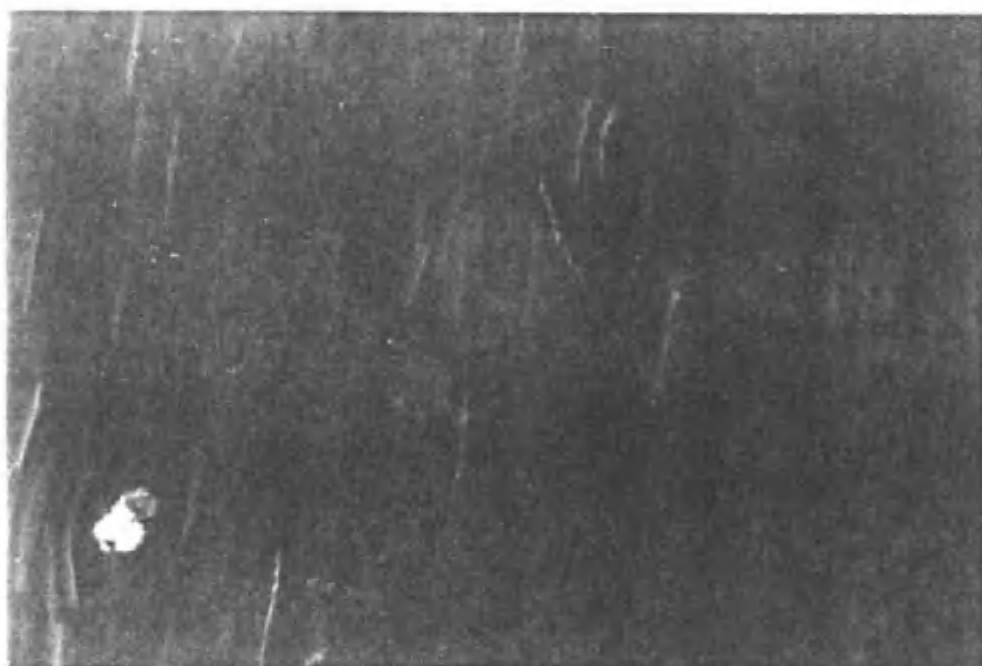
(graf č.4)

čas (min)	teplota (°C)
0	20
10	10
20	0
30	-7
40	-8
50	-11
60	-14
70	-17
80	-20
90	-23
100	-26
110	-29
120	-34
130	-35
140	-35
150	-35
165	-196

Teplovní gradient kryokonzervace embrii (graf č.4)



Obrázek číslo 9



Obrázek číslo 10



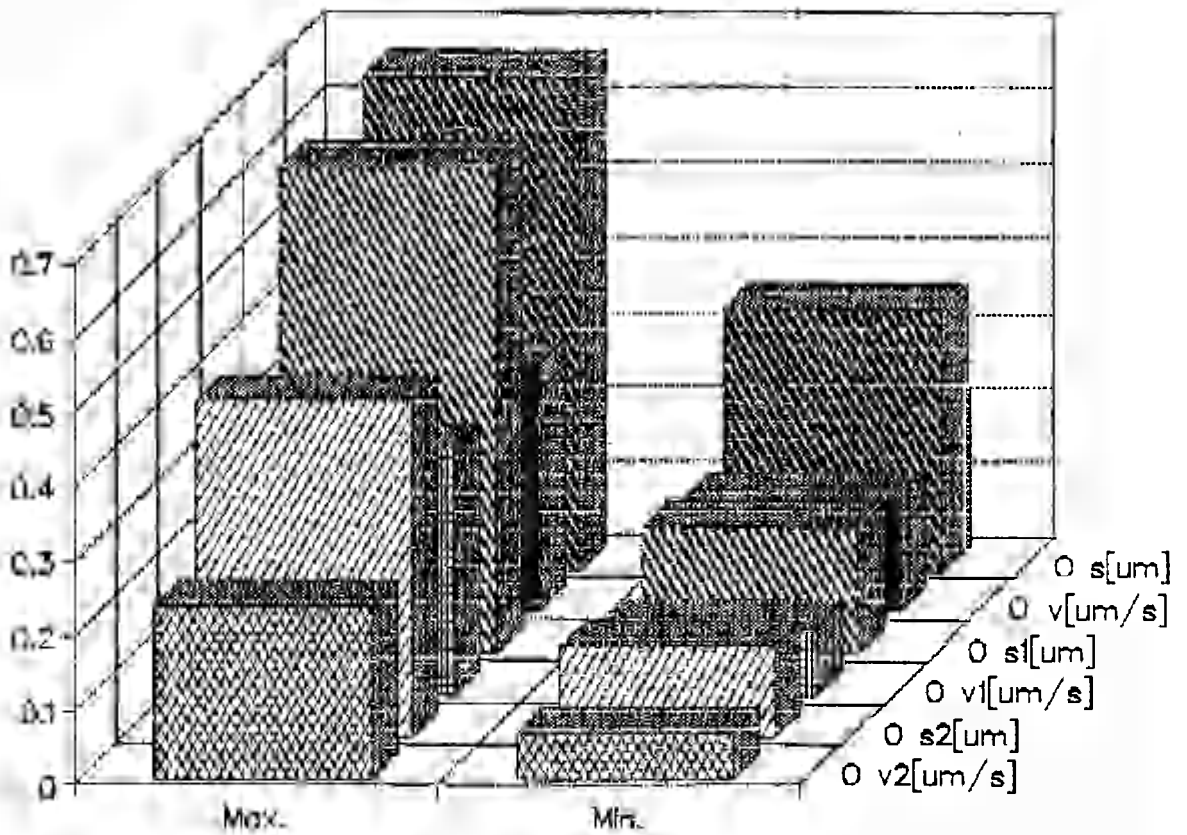
Tabulka číslo 1

	o s(μm)	o v($\mu\text{m/s}$)	o s1(μm)	o v1($\mu\text{m/s}$)	o s2(μm)	o v2($\mu\text{m/s}$)
Max.	0,66	0,33	0,65	0,33	0,45	0,23
Mln.	0,35	0,15	0,17	0,09	0,12	0,08

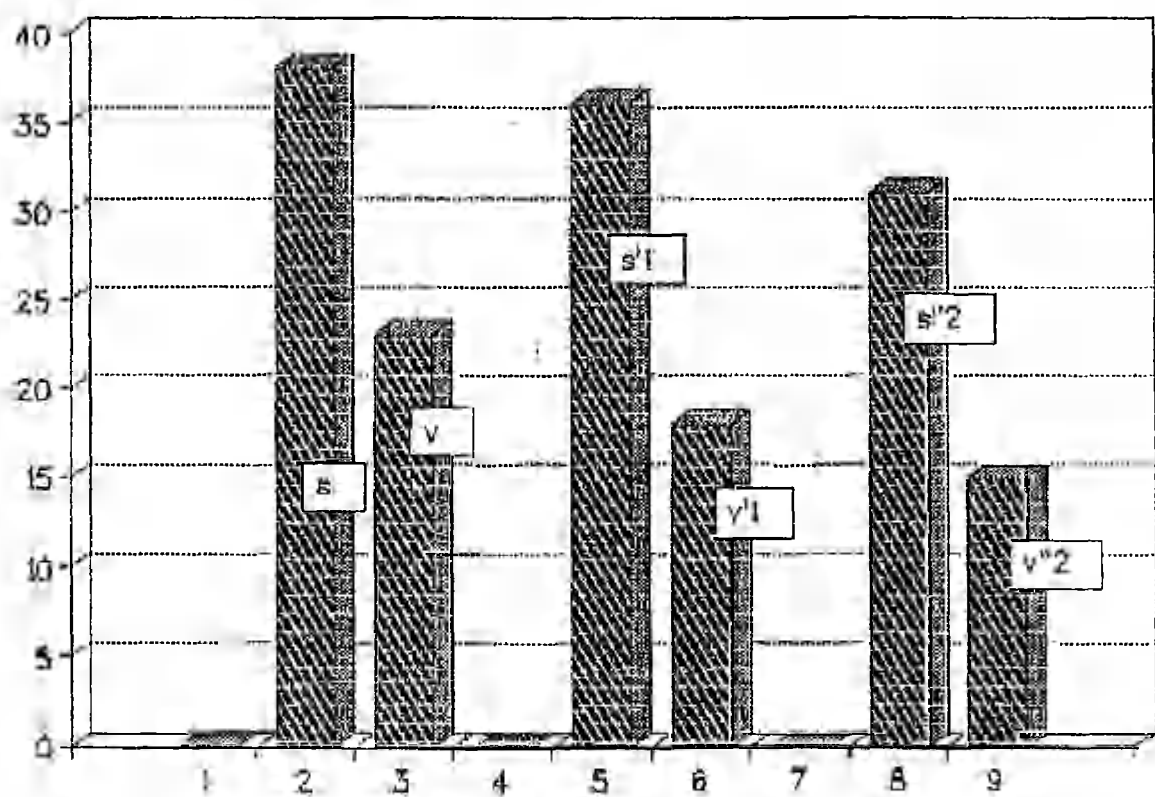
Tabulka číslo 2

o s(μm)	o v($\mu\text{m/s}$)	o s1(μm)	o v1($\mu\text{m/s}$)	o s2(μm)	o v($\mu\text{m/s}$)
0,38	0,23	0,36	0,18	0,31	0,15

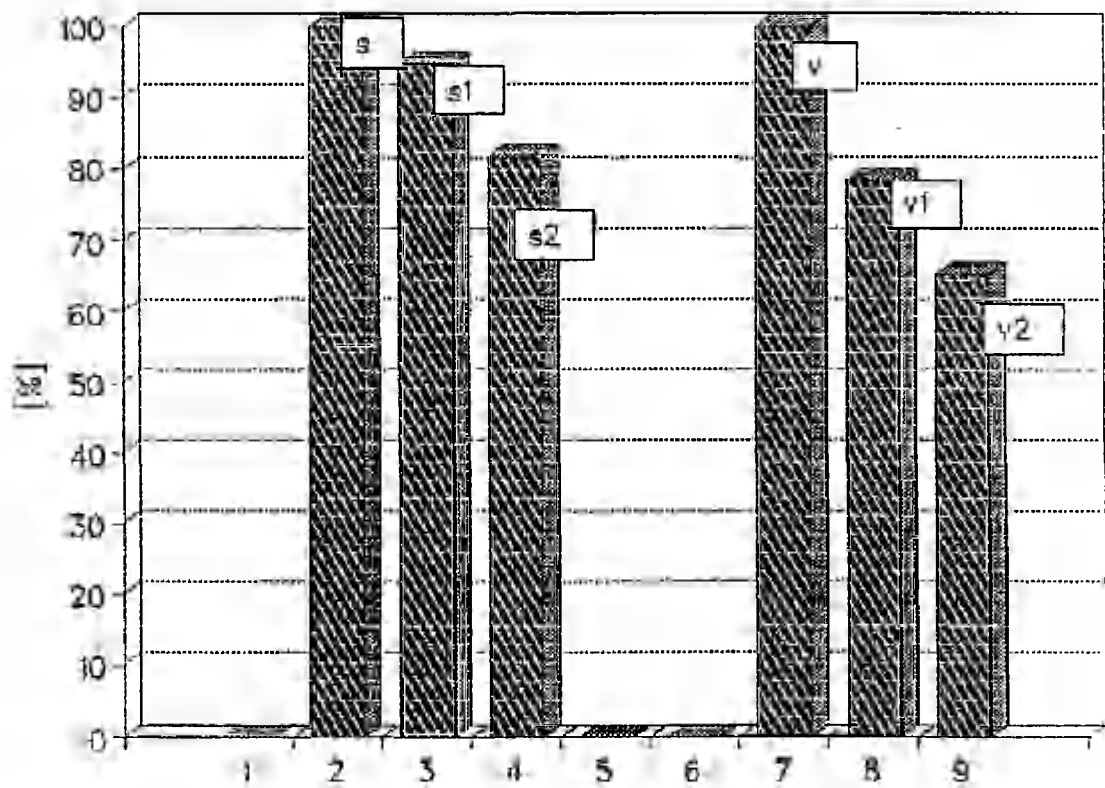
Tabulka číslo 1



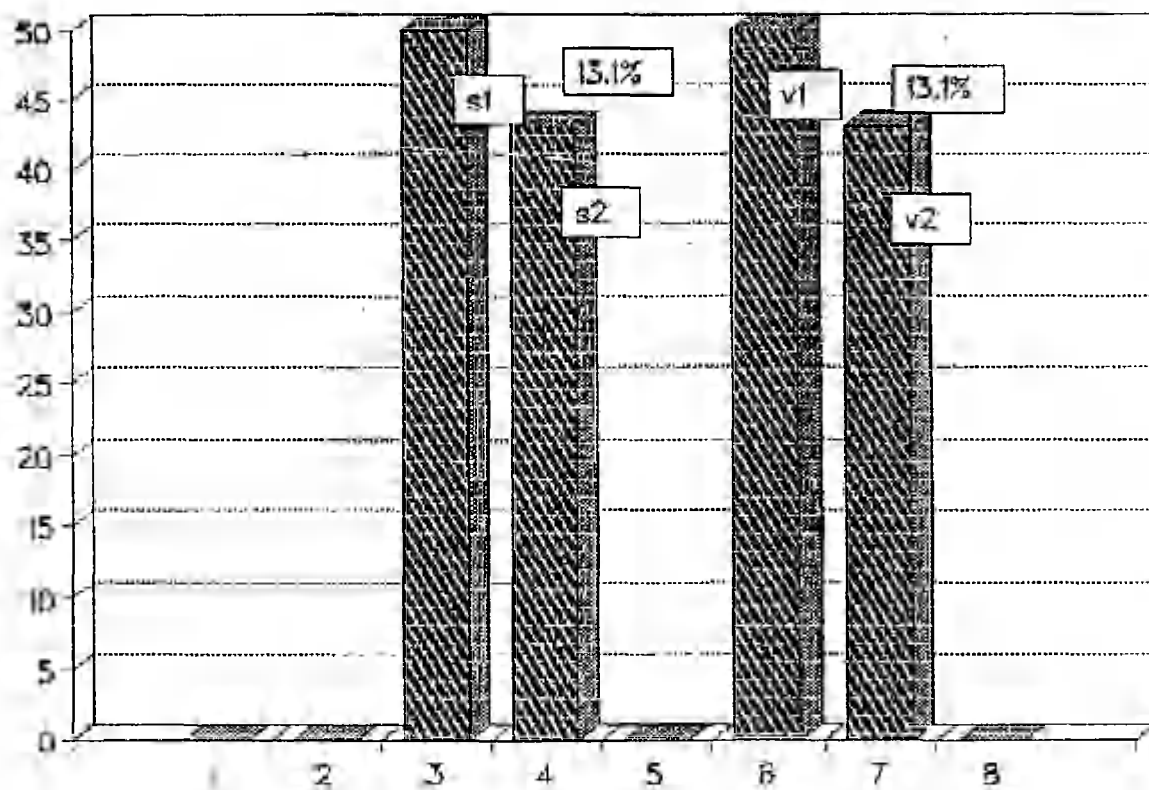
Graf číslo 5



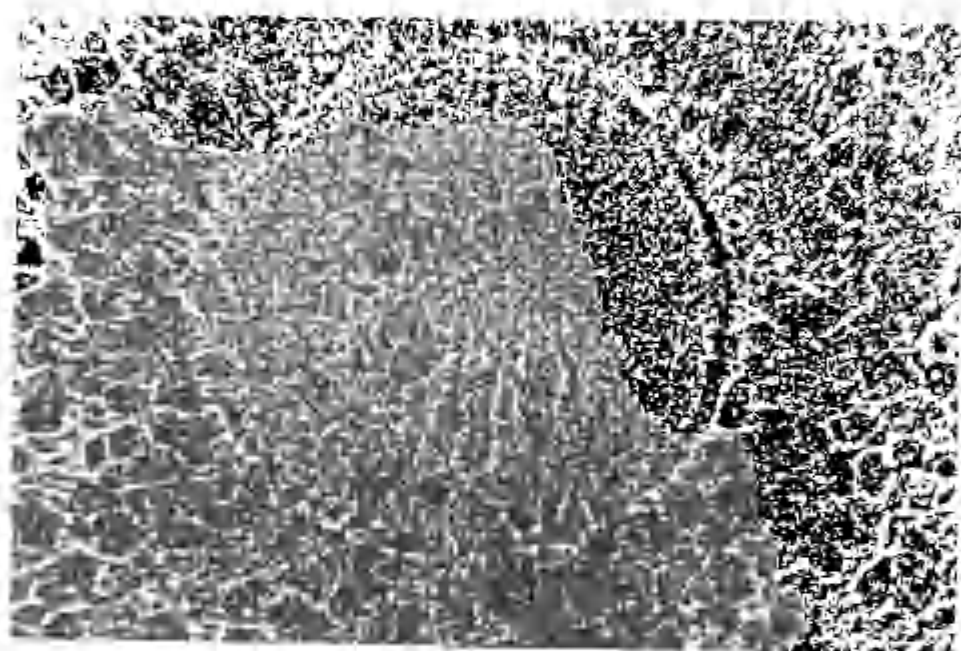
Graf číslo 6



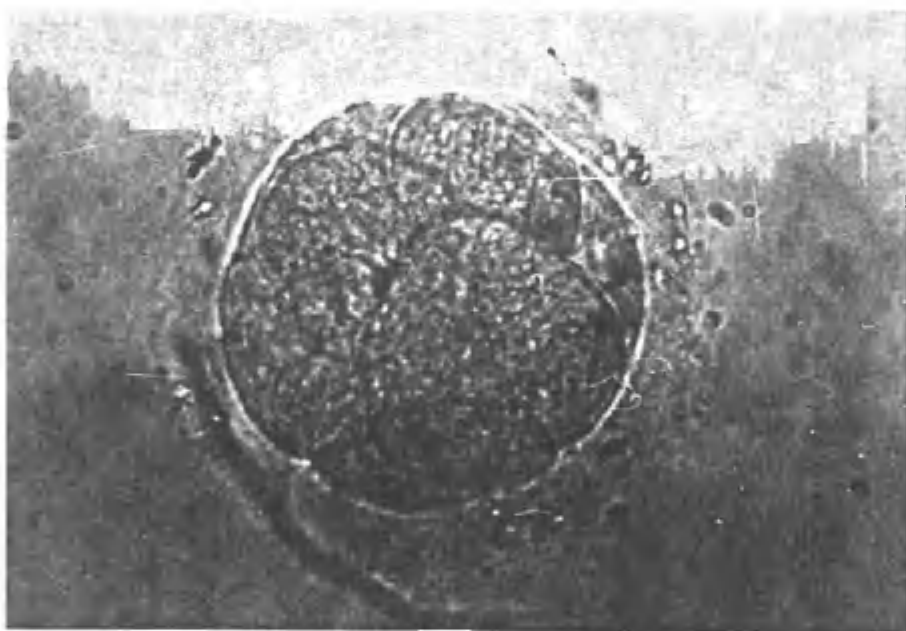
Graf číslo 7



Obrázek číslo 11



Obrázek číslo 12



Poděkování

Je mojí milou povinností poděkovat na konci této práce širokému kolektivu spolupracovníků, kteří mi v začátcích mé práce ochotně poskytli pomoc i materiální zabezpečení. Bez této spolupráce by nebylo možné tuto práci uskutečnit.

Jmenovitě chci poděkovat prof. MVDr. Dr.h.c. Luboši Holému, CSc. a MVDr. Miloslavě Lopatářové, CSc., kteří mně ochotně poskytli své bohaté zkušenosti z oblasti kryokonzervačních technik a umožnili mně v začátcích mé práce využívat své laboratoře na Vysoké škole veterinární v Brně.

Panu Ing. Ladislav Škarkovi, řediteli Výzkumného ústavu potravinářského průmyslu v Hrušovanech nad Jevišovkou, který je spoluautorem kryokonzervačního zařízení použitého v této práci, a který zajistil výrobu tohoto zařízení pro naši kliniku.

Paní Daně Prokopové z Vysoké školy veterinární v Brně děkuji za svědomitou přípravu kryokonzervačních médií použitých při realizaci mé vědecko - výzkumné práce. Také je třeba poděkovat prof. MUDr. Pavlovi Trávníkovi, DrSc.,

RNDr. Alici Malenovské a RNDr. Janě Žákové za spolupráci v oblasti embryologické.

Panu Ing. Stanislavu Žilkovi děkuji za svědomitou technickou a grafickou spolupráci při realizaci této práce.

Mému školiteli prof. MUDr. Ladislavu Pilkovi, DrSc., vyslovuji svůj dík za cenné rady a připomínky k mé práci a za vytvoření dobrých pracovních podmínek pro zpracování této studie.

Paní PhDr. Marcele Vandrové chci poděkovat za jazykovou úpravu.

Na závěr děkuji všem, kteří se mnou sdíleli úspěchy a neúspěchy, neboť i ty se během výzkumu využití kryokonzervačních technik v asistované reprodukci vyskytly.