

# Legislativní a etické otázky spojené s kryokonzervací

**doc. Ing. Michal Ješeta, Ph.D.**

Gynekologicko-porodnická klinika, LF MU a FN Brno

# Mražení embryí problémy

- technika vyvolala mnohé etické, morální a právní problémy
- některé země mají specifické zákony které omezují kryokonzervaci
  - Německo, Švýcarsko, Itálie
- odhaduje se, že v Evropě v roce 2011 přispěla kryokonzervace k celkovému LBR o 4 % (LBR vzrostla z 19,7 % pouze s čerstvými cykly na 24,0 % včetně kryocyklů)
- zemích, kde je kryokonzervace systematicky uplatňována, je tento přínos ještě patrnější: Finsko +13,4 %, Švýcarsko +10,2 % a Austrálie a Nový Zéland +13,5 %

# Etická úskalí kryokonzervace



- embryo má právo na život a právo na zachování integrity
- kryokonzervace narušuje integritu embrya a je tedy morálně nepřípustná
  
- v roce 1996 papež Jan Pavel II. "apeloval na svědomí světových vědeckých autorit a zejména na lékaře, aby **byla zastavena produkce lidských embryí, přičemž je třeba vzít v úvahu, že se zdá, že neexistuje žádné morálně přípustné řešení** týkající se lidského osudu tisíců a tisíců 'zmražených' embryí, která jsou a zůstanou předmětem základních práv, a proto by měla být chráněna zákonem jako lidské osoby.

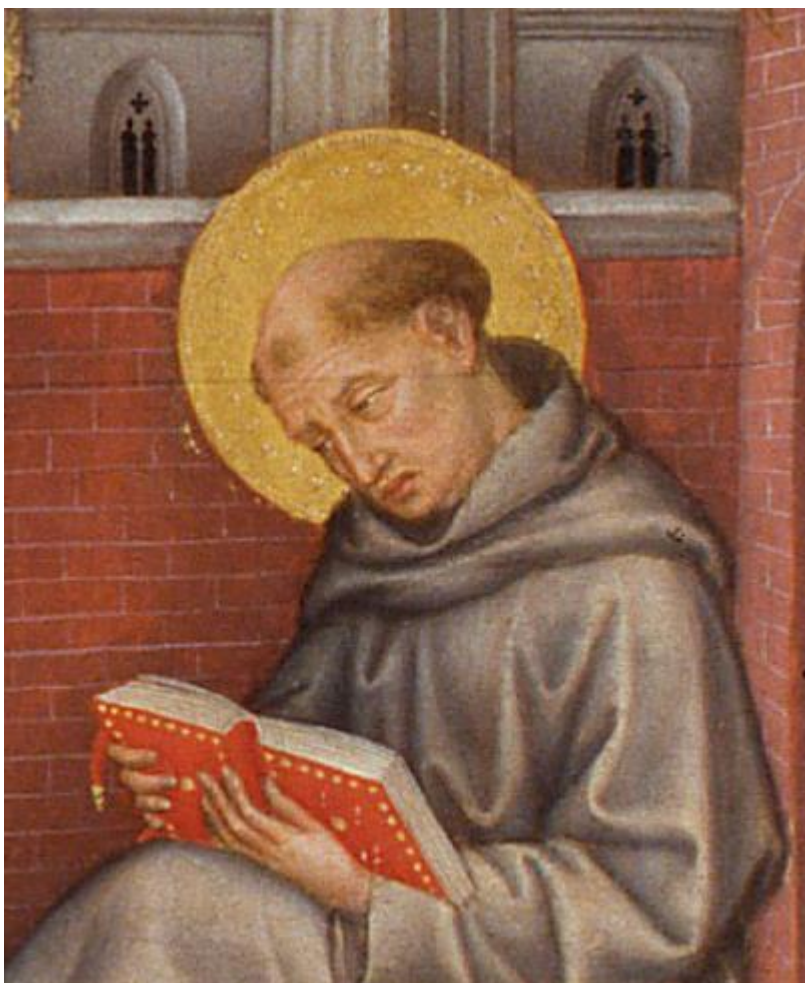
# Etická úskalí kryokonzervace



## Status embrya

- *ontologický personalismus*: všechna lidská práva od počátku početí
- *empirický funkcionalismus*: embryo je lidská bytost odlišná od lidské osoby, která se možná vyvine v lidskou osobu se všemi právy
- *gradualismus*: práva zárodku lineárně rostou s jeho vývojem (zygota 0 % novorozenec 100 %)

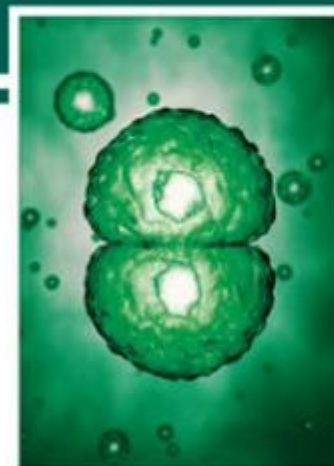
*Marek Orko Vácha např. uvádí, že ...i dospělý jedinec je shlukem buněk. Tak jaký je mezi nimi rozdíl?“*



Tomáš Akvinský (13. století) se domníval, že k výskytu lidské duše dochází se zpožděním.

## JE ZYGOTA LIDSKOU OSOBOU?

Pascal Ide



Pascal Ide „...otázka statusu embrya uniká všem racionálním způsobům rozpravy.“

MUNI  
MED

# **Platná legislativa**

**Zákon o specifických zdravotních službách 373/2011 sb.**

**HLAVA II**

**ZDRAVOTNÍ SLUŽBY POSKYTOVANÉ ZA ZVLÁŠTNÍCH PODMÍNEK**

**Díl 1 Asistovaná reprodukce**

# Podmínky likvidace embryí – v ČR

## § 9 odstavec 1

...Ize je (embrya) uchovat a použít pro další umělé oplodnění této příjemkyně. To neplatí, **jestliže neplodný pár písemně prohlásí**, že tato embrya nehodlá použít pro své další umělé oplodnění **a zároveň udělí souhlas** s jejich:

- **použitím pro jiný anonymní neplodný pár,**
- **nebo udělí souhlas s použitím nadbytečných embryí k výzkumu podle zákona o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách**
- **nebo s jejich likvidací**

***Prohlášení může neplodný pár kdykoliv odvolat***

# Podmínky likvidace embryí – v ČR

## § 9 odstavec 2

Pokud lidská embrya nebyla použita nebo neplodný pár neučinil písemné prohlášení o jejich likvidaci podle odstavce 1, ***může poskytovatel po 10 letech uchování těchto embryí opakovaně prokazatelně písemně vyzvat neplodný pár o vyjádření k dalšímu uchování těchto embryí, včetně udělení souhlasu s jejich zlikvidováním.*** Pokud neplodný pár ***nereaguje na opakovanou prokazatelně zaslanoú písemnou výzvu poskytovatele, lze i bez vyjádření neplodného páru lidská embrya zlikvidovat.***



# Podmínky likvidace embryí – v ČR

## § 9 odstavec 3

Opakovanou písemnou výzvou podle odstavce 2 se rozumí její **prokazatelné zaslání prostřednictvím provozovatele poštovních služeb** na adresu neplodného páru, která je poskytovateli známa, a to **nejméně dvakrát s časovým odstupem nejméně 60 dnů**.

Lhůta pro vyjádření neplodného páru na základě druhé výzvy činí 30 dnů ode dne jejího doručení.

# Podmínky likvidace embryí – v ČR

## § 9 odstavec 4

Výzva je doručena dnem, ***kdy si ji adresát převezme***, jinak se považuje za doručenu uplynutím lhůty ***10 dnů ode dne oznámení*** o jejím uložení u provozovatele poštovních služeb. Jestliže je výzva s ohledem na **změnu adresy neplodného páru nedoručitelná** nebo bylo odmítnuto její převzetí, považuje se výzva za doručenu ***dnem jejího vrácení poskytovateli***.

Obdobně se postupuje, je-li výzva nedoručitelná jen jedné osobě z neplodného páru.

# **Jak je to ve světě**

- **v roce 2017 byla v USA cca 0,6 - 4 miliony opuštěných embryí skladování v USA i 1000 dolarů/ročně**
- **snaha o zdůvodnění limitů a jejich prodloužení (někdy velmi krátké Portugalsko 3 roky), nejčastěji 10 let**
- **07/2022 v UK prodloužena doba skladování z 10 na 55 let (gamety, embrya)**

# Skladování embryí

Table 6 Duration of storage and age limit for use of stored material (oocytes, embryos and ovarian tissue) in different countries. (Information last updated 2020)

	OOCYTES			EMBRYOS			OVARIAN TISSUE		
	Duration of storage	Age limit for use of stored material		Duration of storage	Age limit for use of stored material		Duration of storage	Age limit for use of stored material	
<b>Austria</b>	Limited	lifetime	No limit	Limited	10 years	No limit	Limited	No limit	
<b>Belgium</b>	Limited	10 years (extendable)	< 48 years	Limited	5 years (extendable)	< 48 years	Limited	10 years (extendable)	No legislation - no limit
<b>Bulgaria</b>	Limited	5 years (extendable)	No limit	Limited	5 years (extendable)	No limit	No limit		Not defined
<b>Croatia</b>	Limited	5-10 years (extendable but paid by patient)	42 years of age	No limit		No limit			Still not being implemented
<b>Cyprus</b>	Limited	10 years (extendable)	50 years	Limited	10 years (extendable)	50 years	Limited	10 years (extendable)	50 years
<b>Czech Republic</b>	No limit		No limit	No limit		No limit	No limit		No limit
<b>Denmark</b>	Limited	5 years	35 years	Limited	5 years	45 years			
<b>Finland</b>	Limited	Defined by clinic	Defined by clinic - up to 50 years	Limited	Defined by clinic	Defined by clinic - up to 50 years	Limited	Defined by clinic	Defined by clinic - up to 50 years
<b>France</b>	No limit		Current practice is - 45 years	No limit		Current practice is 45 years	No limit		Not defined (Current practice is 42-43 years)
<b>Georgia</b>	No limit		Not regulated	No limit		Not regulated	No limit		Not regulated
<b>Germany</b>	No limit	Defined by clinic	Recommended maximum age <50y						
<b>Hungary</b>	Limited	10 years	< 50 years	Limited	10 years	< 50 years	No limit		Not regulated (< 50 years)
<b>Ireland</b>	No limit		No limit	No limit		No limit	No limit		No limit
<b>Italy</b>	No limit		50 years	No limit		50 years	No limit		50 years
<b>Lithuania</b>	No limit		No limit	No limit		No limit	No limit		No limit
<b>Montenegro</b>	Limited	Defined by clinic, current practice is 2 times 3-5 years	Defined by clinic - 48 years	Limited	Current practice is 3-3 years	Not regulated, current practice is 45-47 years	No limit		Not regulated
<b>Netherlands</b>	No limit		49 years	No limit		49 years	No limit		49 years
<b>Norway</b>	Limited	Not defined, extending natural fertility is not allowed	46 years	Limited	5 years	46 years	No limit		46 years
<b>Poland</b>	No limit		Not defined	Limited	20 years <sup>1</sup>	Not defined	No limit		Not defined
<b>Portugal</b>	Limited	5 years (extendable)	< 50 years	Not allowed for FP			Limited	5 years (extendable)	< 50 years
<b>Romania</b>	No limit		Not regulated, current practice is 50 years	No limit		Not regulated, current practice is 50 years	No limit		Not specified

	OOCYTES			EMBRYOS			OVARIAN TISSUE		
	Duration of storage	Age limit for use of stored material		Duration of storage	Age limit for use of stored material		Duration of storage	Age limit for use of stored material	
<b>Russian Federation</b>	No limit		No limit	No limit		No limit	No limit		No limit
<b>Serbia</b>	No limit		Not specified in legislation	Limited	5 years (extendable to 10 years)	Not specified in legislation	No limit		Not specified in legislation
<b>Slovenia</b>	Limited	10 years	Women of reproductive age	Limited	10 years	Women of reproductive age	Limited	10 years	Women of reproductive age
<b>Spain</b>	No limit		Not specified in legislation - current practice is 50 years			Not specified in legislation - current practice is 50 years	No limit		Not specified in legislation - current practice is 50 years
<b>Sweden</b>	No limit		45-50 years	Limited	10 years	45-50 years	No limit		45-50 years
<b>Switzerland</b>	Limited	10 years, unless stored for medical reasons	No limit	Limited	10 years	No limit	Limited	10 years, unless stored for medical reasons	No limit
<b>Turkey</b>	Limited	5 + 5 years (extendable)	No limit	Limited	10 years	No limit	Limited	10 years	Not regulated
<b>Ukraine</b>	No limit		Defined by infertility specialist	No limit		No limit	No limit		Defined by infertility specialist
<b>United Kingdom</b>	Limited	10 years (extendable under conditions)	No limit, current practice is 50-55 years	Limited	10 years (extendable)	No limit, current practice is 50-55 years	No limit		No limit

# Kryokonzervované gamety

- **Neexistuje zákonná úprava!!!**
- **týká se jen 1 osoby**
- **uskladnění není vymahatelné, pokud klient neplní podmínky smlouvy s TZ (náklady na skladování), likvidace je možná**
- **Jedná se o vzácný materiál – vždy dobré mít souhlas s likvidací**

# Blízký východ



- dlouho bylo zmrazení vajíček v regionu zakázáno pro neprovdané ženy, vdané ženy mohly tento zákrok podstoupit se souhlasem svého manžela
- 2008 změna ve **Spojených arabských emirátech-zákon** č. 11/2008, který zakazoval zmrazování embryí, gamet a jakéhokoli jiného reprodukčního materiálu
- **zrušen federálním zákonem č. 7/2019** - nyní lze zmrazit vajíčka ze sociálních i zdravotních důvodů (před chemoterapií radiační léčbou, nebo u těch, kterým hrozí předčasné selhání vaječníků)
- svobodným ženám je povoleno nechat si zmrazit vajíčka a mohou je použít pouze pro vlastní těhotenství po svatbě se spermiemi svého manžela při postupu IVF

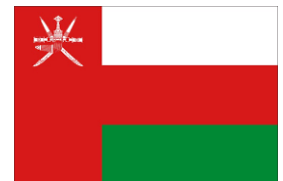
## Další země Asie



- v **Bahrajnu** je povoleno skladování gamet po dobu až 10 let a embrya po dobu 5 let a léčba je opět dostupná pouze manželským párům.
- v **Saúdské Arábii**, kde je IVF léčba od svého zavedení v 80. letech 20. století stále populárnější neexistuje žádné časové omezení pro uchovávání, ale léčba může probíhat pouze v rámci manželské smlouvy, která musí být doložena



- v **Ománu** je skladování zmrazených vaječ po dobu 5 let a poté podléhá každoroční obnově.



# Etická úskalí kryokonzervace



- **Itálie** zákon v roce 2004 (40/2004) – max 3 embrya (oplození max 3 oocytů), ale žádné se nesmí mrazit!!! - zákaz PGT
- odhad byl zhoršení efektivity IVF asi o 2/3
- zakázáno mražení spermatu a to i u onkologických pacientů !!
- 2009 italský ústavní soud (151/2009) prohlásil kryokonzervaci embryí za legitimní



# Nejdelší skladování embryí

- Emma Wren Gibson narozena 2017 (skladování 24 let) rekord (zamrazeno 1992)
- mladší sestra Molly narozena 2020 (skladování 27 let – nový rekord)
- maminka Tina Gibson narozená 1991
- prostřednictvím NEDC které bylo založeno 2003 a zprostředkovalo už více než 1000 porodů prostřednictvím adopce embryí



The Gibson family.  
HALEIGH CRABTREE PHOTOGRAPHY.  
HALEIGHCRABTREEPHOTOGRAPHY.COM

# Doba skladování - nejdelší skladování

- listopad 2022 dvojčata narozená z embryí která byla zamražena 22.4.1992 (29 let a 10 měsíců)
- National Embryo Donation Center
- z 5 nebyly 2 životaschopné, ET 3 embrya
- Philip and Rachel (33) z Oregonu



The embryos which led to the birth of Lydia and Timothy Ridgeway (pictured) were frozen in 1992, the year Bill Clinton ran for the Presidency in the US and 'Black Wednesday' rocked the markets in Britain



They were born on October 31st in what their parents Philip and Rachel (pictured) called a 'mind-boggling' birth

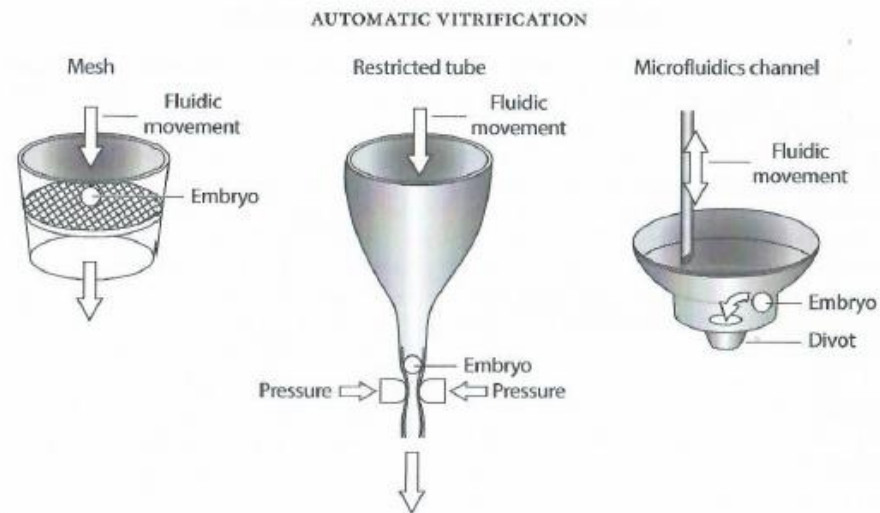
# Automatizace procesu vitrifikace oocytů

– Laura Rienzi z italské společnosti

GeneraLife: *obrovský přínos má vitrifikace oocytů pro životy tolika lidí, a také se zaměřila na automatizovanou vitrifikaci, která, jak řekla, zajistí "kvalitu procesu" tím, že standardizuje načasování, objemy a postupy.* "Měli bychom se zaměřit na standardizaci a automatizaci," řekla, "ale tam ještě nejsme."



# GAVI



# System Sarah Arav et al., 2018

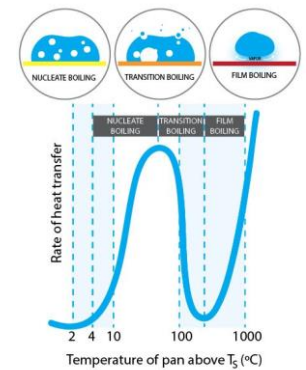
- Fertisafe Israel
- dostupnost automatizovaného vitrifikačního zařízení stane nepostradatelným pro standardizaci, zjednodušení a reprodukovatelnost celého procesu



# Leidenfrostův jev

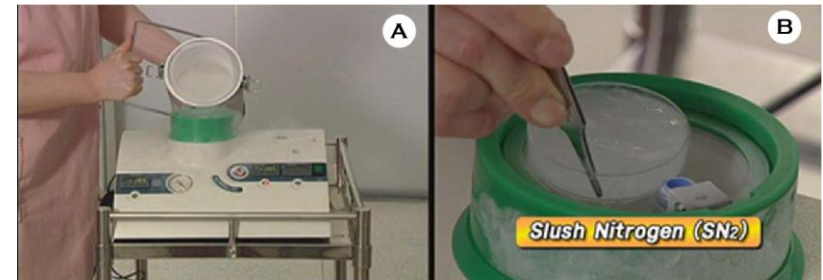


- při styku kapaliny s povrchem, který značně převyšuje teplotu látky, dochází k vypařování části objemu kapaliny, které je doprovázeno Leidenfrostovým jevem
- kapalina v kontaktu s výrazně teplejším povrchem (rozdíl teplot musí být alespoň 193 °C) vypaří část svého objemu a vytvoří tím páru, která kapalinu tepelně izoluje, kapalina vytváří drobné kuličky, které se pohybují a odpařováním neustále zmenšují
- Leidenfrostův jev se nevyskytuje jen u vody, např. tekutý dusík (-195,8 °C) při kontaktu s objekty pokojové teploty (nebo lidského těla) vytváří tenkou izolační vrstvu páry



# Slush nitrogen

- hlavní výhoda snížení vaporizace
- cooling rate 15000 – 30000/min kapalný dusík (-196 C)
- 135 000/min slush nitrogen (-210 C) zařízením VitMaster (IMT Ltd, Ness Ziona, Izrael), které působením podtlaku snižuje teplotu LN na -205 až -210 °C
- snižuje negativní Leidenfrostuv efekt – vaporizace po solidifikaci
- rychlost ochlazení se zvyšuje až 6x oproti LN
- použití slush N výrazně rychlejší zamražení, lepší přežitelnost embryí (Osman et al., 2020)



Vitrification Cycle	Liquid N <sub>2</sub>		Slush N <sub>2</sub>	
	# Survived Embryos	Survival % (95% CI)	# Survived Embryos	Survival % (95% CI)
1	41	82 (68.2-90.2)	50	100
2	31	62 (47.1-73.8)	50	100
3	24	48 (33.7-60.9)	50	100
4	12	24 (13.3-36.4)	46	92 (80.1-97.0)
5	10	20 (10.3-32.0)	40	80 (66.0-88.7)
6	8	16 (7.5-27.4)	34	68 (53.2-79.0)
7	6	12 (4.8-22.6)	27	54 (39.3-66.6)
8	3	6 (1.6-14.9)	25	50 (35.6-62.8)
9	2	4 (0.7-12.1)	23	46 (31.9-59.0)

# Antioxidanty

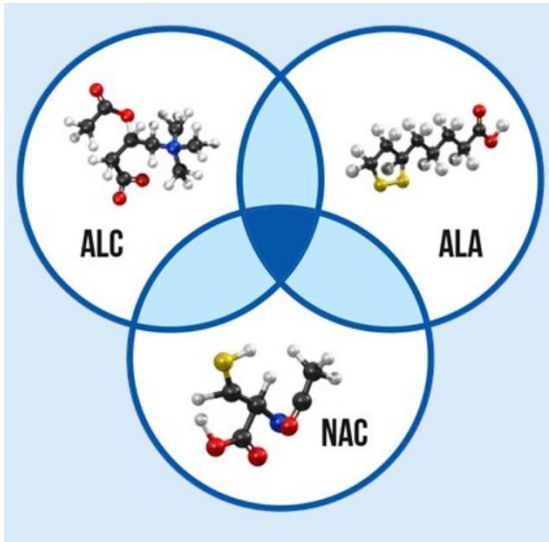


Prof. David Gardner

- přítomnost **antioxidantů** během kryokonzervace má významné příznivé účinky na vývoj embrya, a to pravděpodobně prostřednictvím snížení oxidačního stresu
- použití antioxidantů do roztoků **pro kryokonzervaci** by proto mohlo představovat cennou strategii pro zlepšení vývoje a životaschopnosti embryí
- tyto údaje jsou příslibem pro zlepšení výsledků přenosu KET v klinickém IVF, v současné době probíhají studie zaměřené na tuto problematiku



# Gx media



Acetyl-L-Carnitine, Alpha-Lipoic Acid and N-Acetyl-L-Cysteine have a highly beneficial effect on embryo



Gx-IVF™



Gx-TL™

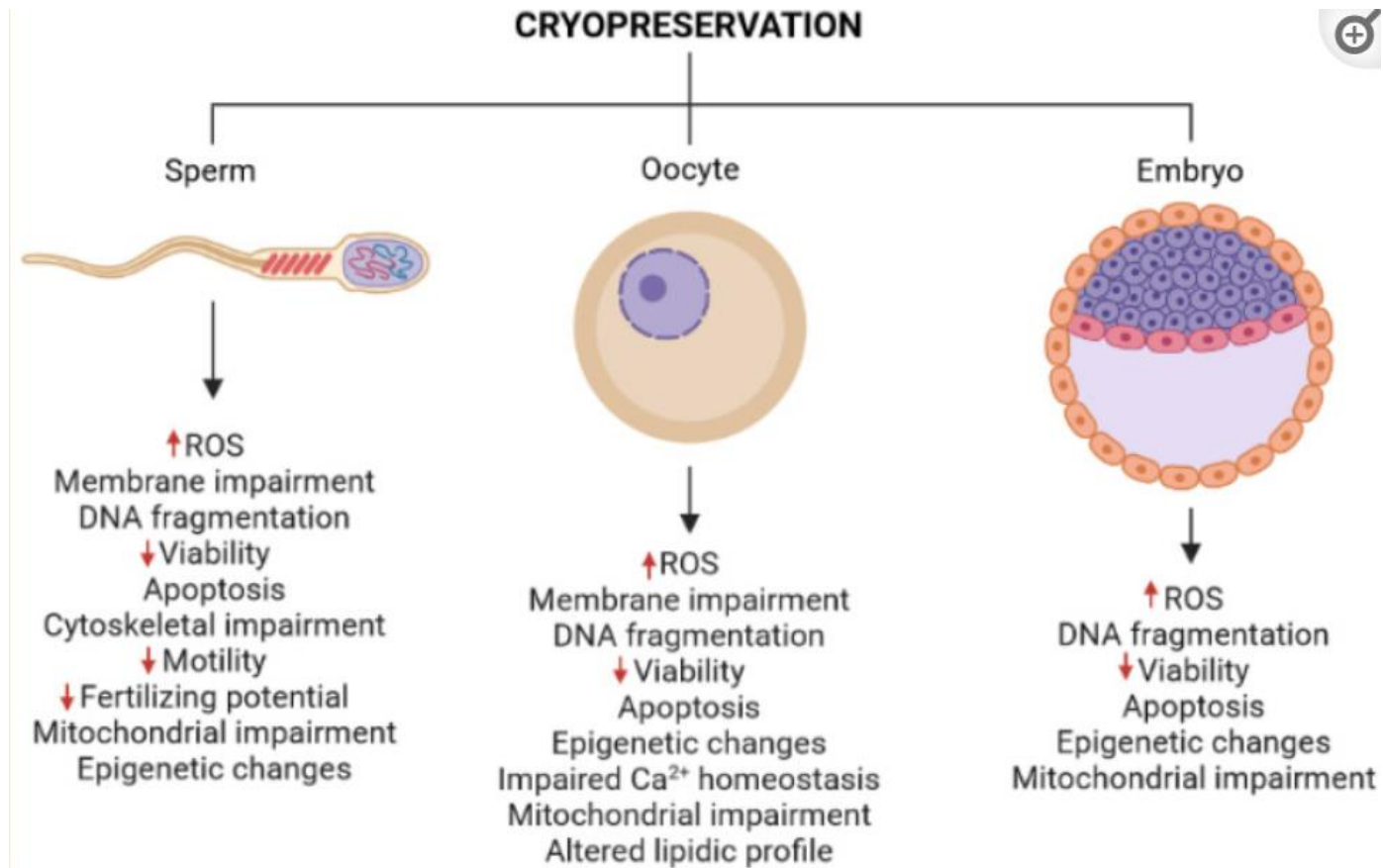


Gx-MOPS™ PLUS

# Hodnocení kryokonzerace embryí - kryoprotektiva

- přímá **toxická CPA** je potenciálním zdrojem škod s neznámými důsledky  
DMSO a EG mohou indukovat metylaci a strukturální změny v chromatinu.  
DMSO může také usnadnit dvouřetězcové **zlomy DNA**
- poškození vyvolané CPA závisí na koncentraci, kolísání pH, teplotě, stupni hyperosmotického stresu a tvorbě reaktivních forem kyslíku
- změny v propustnosti membrán k rychlé výměně přítoku vody, která modifikuje morfologii embryonálních buněk to končí **nuceným zastavením metabolismu** poté co jsou embrya ponořena do tekutého dusíku
- tato přechodná variabilita v dynamice štěpení embrya vyjadřuje morfologické rozdíly ve tvaru a velikosti blastomer, přítomnost fragmentů, asymetrii mezi buňkami, rozdíly ve stavu buněčného cyklu

# Efekt kryo na rep. bunky



# Epigenetika

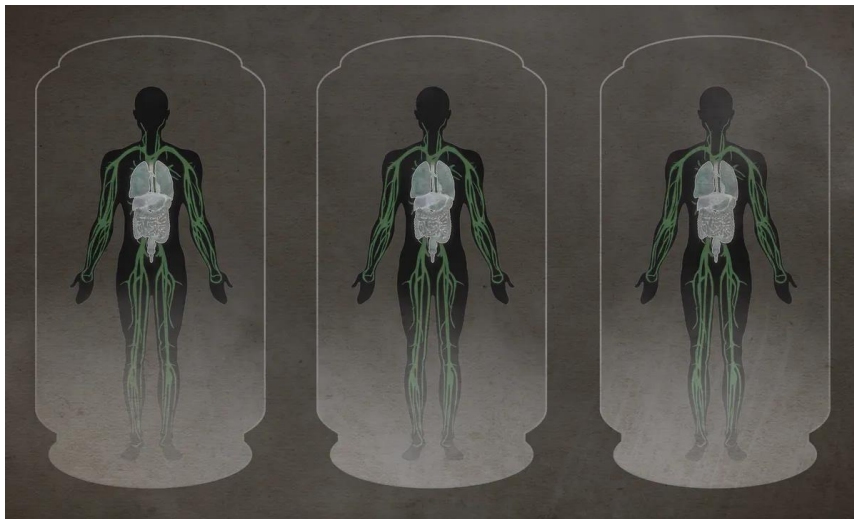
- vitrifikace snížila **acetylaci histonů** H3K9 a H3K27
- **antioxidanty zmírnily** takové poruchy acetylace histonů, i když jejich podávání bylo nedostatečné k obnovení epigenetických značek na normální úroveň
- antioxidanty zvýšily míru přežití embryí a jejich růst poté, co byla podrobena vitrifikaci
  
- byly studovány také modifikace chromatinu kryokonzervací to ukázalo, že myší **blastocysty jsou odolnější** vůči poruchám způsobeným kryokonzervací než moruly
  
- postupy **pomalého zmrazování ovlivňují integritu chromatinu více** než vitrifikace; naopak hladiny ROS jsou vyšší ve vitrifikačním protokolu ve fázích moruly než při pomalém zmrazování.

# Aneuploidie fresh vs vitri

- ploidy embryí podstoupily PGT-A s vitrifikovanými oocyty ve srovnání s čerstvými oocyty
- primárním výsledkem byl poměr euploidních, mozaikových a aneuploidních embryí mezi těmi, kteří používali vitrifikované a čerstvé
- ploidy embryí, **nebyly mezi oběma skupinami zjištěny** statisticky významné rozdíly v míře euploidie (40,1 % vs. 41,6 %), mozaicismu (15,7 % vs. 12,0 %) nebo aneuploidie (44,3 % vs. 46,4 %) ( $p = 0,06$ ).
- Vitifikace oocytů s následným zahřátím, oplozením a biopsií trofektodermu pro PGT-A nebyla spojena s nepříznivou chromozomální kompetencí ve srovnání s věkově odpovídajícími kontrolami s použitím čerstvých oocytů.

# Kryonika – společnost Alcor

- kryokonzervace těl lidí i zvířat (domácí mazlíčci)
- nejsou schopni nikoho rozmrazit, ale dosud byla zamraženo desítky těl (1927 členů a 225 těl a 119 mozků v roce 2023)
- uskladnění v kapalném dusíku neomezeně dlouho
- technika vitrifikace



MUNI  
MED

Děkuji Vám za pozornost !

