

KS. ARKADIUSZ OLCZYK
CZĘSTOCHOWA

HISTORIA I TECHNIKI SZTUCZNEGO ZAPŁODNIENIA

Wstęp

Większość par małżeńskich po jakimś czasie trwania ich związku planuje posiadanie potomstwa. Jednak nie zawsze jest to możliwe, bowiem 15-20% par boleśnie doświadcza niepłodności. Na niepłodność ma wpływ szereg czynników, takich jak: wiek małżonków, przebyte choroby czy operacje. Powodów poszukuje się, poddając niejednokrotnie pacjentów długotrwałej procedurze diagnostycznej. Przyczyny leżą w równej mierze po stronie kobiety, jak i mężczyzny. U 15% diagnozowanych małżonków nie udaje się ich jednak w ogóle ustalić (to tzw. niepłodność idiopatyczna). Niemożność posiadania biologicznego potomstwa jest nierzadko powodem wielu stresujących sytuacji w samym małżeństwie, ale także w rodzinie pochodzenia, w najbliższym i dalszym otoczeniu.

Pragnienie urodzenia dziecka za wszelką cenę oraz postęp nauk medycznych przyczyniły się do powstania wielu metod rozrodu wspomaganego medycznie. Metody te powstały obok metod leczenia niepłodności. Obecnie coraz częściej te metody zastępują leczenie przyczynowe niepłodności, i coraz więcej małżeństw jest pochopnie kierowanych do sztucznej prokreacji, nawet w takich przypadkach, w których jest możliwa terapia niepłodności. Ponadto metody te umożliwiają poczęcie dziecka w sytuacji, w której bez ich użycia nie jest to możliwe, np. poczęcie *post mortem* – jedna albo obie gamety mogą pochodzić od nieżyjących osób, gamety te zostały zdeponowane w banku gamet za życia tych osób, albo pobrane w trakcie lub tuż po ich śmierci. Jest też możliwe wydobycie gamet z organizmu sztucznie utrzymwanego przy życiu po śmierci mózgu. Ponadto tymi metodami są uzyskiwane embriony w celach pozarozrodczych, takich jak np. badania naukowe. Stąd też warto zapoznać się z historią sztucznego zapłodnienia oraz poznać techniki zapłodnienia *in vivo* (sztuczna inseminacja) oraz *in vitro* (zapłodnienie pozaustrojowe; w szkle).

Historia sztucznego zapłodnienia

Techniki sztucznego zapłodnienia nie są czymś nowym. Pierwsze próby zastosowania metod *in vivo* na zwierzętach miały miejsce już w XVII wieku. Próby sztucznej inseminacji były podejmowane wówczas na: jedwabniku, łososiu, pstrągu i pająku. W 1782 r. włoski przyrodnik Lazzaro Spallanzani przeprowadził pierwszą udaną próbę sztucznego unasiennienia psiej suki, zakończoną urodzeniem żywego szczenięcia. W 1776 r. badał on wpływ zamrożenia męskich komórek rozrodczych (spermatocytów) na ich witalność.

Pierwsze zakończone powodzeniem sztuczne zapłodnienie metodą *in vivo* u kobiety z użyciem nasienia męża wykonał W. Hunter w 1799 r. W XIX wieku podjęto kolejne udane próby sztucznej inseminacji homologicznej (z komórek rozrodczych małżonków). Z kolei pierwsze udane unasiennienie heterologiczne (przynajmniej jedno z dawców jest spoza małżeństwa) wykonał w 1884 r. Wiliam Pancoast.

Dnia 17 marca 1897 r. miała miejsce pierwsza interwencja Magisterium Kościoła w sprawie sztucznego zapłodnienia *in vivo*. Sztuczna inseminacja wykonywana na człowieku została oceniona negatywnie. Na zapytanie: „Czy można stosować sztuczne zapłodnienie kobiety?” - padła krótka, zdecydowana odpowiedź: „Nie godzi się”.

Od 1899 r. w USA Dickinson praktykował inseminację heterologiczną na wielu kobietach z wykorzystaniem nasienia różnych dawców. Od 1953 r. zaczęto wykonywać inseminację z użyciem nasienia wcześniej zamrożonego w „banku spermy”.

W 1890 r. W. Heape po raz pierwszy wykonał udane przeniesienie embrionów na ssakach. Ten eksperyment dał początek próbom przenoszenia embrionów kóz, szczurów, owiec, które były wykonywane od lat 30. XX wieku. W latach 40. XX wieku podjęto transfery embrionów myszy i krów, zaś w latach 50. ubiegłego wieku przenoszono embriony świń, a w latach 70. – koni.

W. Chang odkrył kapacytację plemników. Kapacytacja jest procesem chemicznym, który umożliwia plemnikowi wnikięcie do żeńskiej komórki jajowej. Ponadto uczony ten ulepszył procedurę wydobywania komórki jajowej poprzez jej wymycie z jajowodu.

R. Harrison w 1907 r. rozpoczął hodowanie komórek nerwowych w laboratorium. Eksperyment ten zakończył się sukcesem, co zachęciło innych naukowców do prób hodowli embrionów w warunkach laboratoryjnych.

U kobiety, w przeciwieństwie do większości zwierząt, cykl owulacji uwalnia z jej organizmu jedną komórkę jajową. Celem zwiększenia szansy powodzenia sztucznego zapłodnienia już od lat 30. XX wieku prowadzono badania nad stymulacją farmakologiczną nadowulacji czyli owulacji z uwolnieniem większej liczby komórek jajowych w jednym cyklu miesięcznym. Po raz pierwszy stymulację owulacji z użyciem estrogenów dokonał w 1935 r. Clauberg. Po nim Grinblatt wraz z współpracownikami przeprowadzili stymulację owulacji z użyciem klomifenu w 1961 r. Natomiast rok

później Lundfeld ze współpracownikami wykorzystał do tego celu gonadotropiny. W kolejnym roku Klimek przeprowadził stymulację owulacji za pomocą naturalnych hormonów podwzgórzowych, a w 1972 r. Kastin ze swymi współpracownikami użyli syntetycznych hormonów podwzgórzowych. Z kolei w 1975 r. Thorner ze swoim zespołem badawczym wywołali nadowulację za pomocą bromokryptyny.

W 1958 r. A. McLaren i J. Biggerson wyhodowali w laboratorium zarodki myszy. Udało się im doprowadzić je do stadium blastocysty, którą implantowali do macicy myszy. W 1959 r. prof. Chan przeprowadził udaną procedurę zapłodnienia „in vitro” (IVF - in vitro fertilisation) u królika, zakończoną urodzeniem żywego zwierzęcia. W 1961 r. Palmer opisał pierwsze udane laparoskopowe pobranie żeńskich komórek jajowych. W tym samym roku Danilo Carlo Petrucci dokonał zapłodnienia ludzkiej komórki jajowej *in vitro* i uzyskaną w ten sposób zygotę utrzymał przy życiu w warunkach laboratoryjnych przez kilka dni. Dwa lata później, w Bolonii, ten włoski uczony dokonał kolejnego zapłodnienia *in vitro* i otrzymany embriion utrzymał przy życiu przez 59 dni.

W 1969 r. Brytyjczyk Robert Geoffrey Edwards rozpoczął jako profesor uniwersytetu w Cambridge prace nad metodą *in vitro* u człowieka. Przed nim brytyjski chirurg ginekolog dr Patrick Steptoe z Oldham opracował podłoże do zapłodnienia pozaustrojowego: poddawał kobiety stymulacji hormonalnej celem wywołania nadowulacji oraz opracował laparoskopowe pobieranie komórek jajowych. Po nim w różnych krajach, włącznie z terytorium byłego Związku Sowieckiego, dokonywano zapłodnień *in vitro* i utrzymywano przy życiu tak poczęte istoty ludzkie do dwóch miesięcy w warunkach laboratoryjnych.

W 1973 r. Carl Wood i John Leeton wraz z zespołem badawczym przeprowadzili procedurę zapłodnienia pozaustrojowego zakończoną udanym wszczepieniem embriionu do macicy. Rozpoczęta tą procedurą ciąża zakończyła się jednak poronieniem.

W 1976 r. dr Steptoe i dr Edwards prowadzili dalsze prace nad poszczególnymi etapami zapłodnienia pozaustrojowego u ludzi. Prace te opisali w raporcie, który został zamieszczony w czasopiśmie „Lancet”. Uzyskali oni zarodek w stadium pomiędzy morułą a blastocystą, z którego otrzymali ciążę, która okazała się być ciążą pozamaciczną i została szybko usunięta.

W 1977 r. u małżeństwa Lesley i Johna Brown, które było niepełne z powodu niedrożności jajowodów u Lesley i przez 9 lat bezskutecznie starali się o dziecko, naukowcy ci przeprowadzili pierwszą zakończoną powodzeniem procedurę IVF, uzyskali ciążę, która zakończyła się 25 lipca 1978 r., o godzinie 23.47 narodzinami pierwszego na świecie dziecka poczętego metodą *in vitro*, Louise Brown. Poród odbył się przez „cesarskie cięcie” w Oldham General Hospital. W 2010 r. uhonorowano prof. Edwardsa 101. Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

W dniu 26 stycznia 1979 r. dr Steptoe i dr Edwards przedstawili całą procedurę IVF na spotkaniu Royal College of Obstetricians and Gynecologists na konferencji

American Fertility Society w San Francisco. Na tym spotkaniu dr Steptoe zadeklarował 10% skuteczność tej metody i przewidywał, że w toku dalszych prac jest możliwe dojście do 50% jej skuteczności. Po tym, jak Brytyjska Rada Badań Naukowych odmówiła dalszego finansowania prac nad IVF, fundusze na dalsze prace ci dwaj brytyjscy uczeni pozyskiwali ze źródeł prywatnych. W 1980 r. dr Steptoe i dr Edwards założyli pierwszą klinikę wspomaganego rozrodu – Bourn Hall w Cambridge.

Następne dzieci poczęte metodą *in vitro* przysły na świat w 1980 r. w Australii i Włoszech, dwa lata później we Francji. W 1983 r. dokonano pierwszego przeniesienia embrionu poczętego metodą *in vivo*, który po zapłodnieniu został pobrany z macicy matki i wszczepiony do macicy innej kobiety. Przed transferem została wykonana synchronizacja cyklu menstruacyjnego biorczyni z cyklem menstruacyjnym dawczyni. Metoda ta wcześniej była praktykowana jedynie w weterynarii. W ten sposób powstała surogacja. Od 1982 r. prowadzone były badania nad kriokonserwacją gamet i embrionów. Pierwsze dziecko, którego embrion przed implantacją został poddany kriokonserwacji, urodziło się w 1984 r.

W Polsce pierwsze dziecko poczęte za pomocą metody *in vitro* urodziło się w 1987 r. w Instytucie Ginekologii i Położnictwa prof. Mariana Szamatowicza w Białymstoku. Od tego czasu sztuczne zapłodnienie metodami *in vivo* oraz *in vitro* jest praktykowane w coraz większej liczbie ośrodków i klinik ginekologicznych. Techniki te są nadal rozwijane i udoskonalane.

Pierwsze dziecko, poczęte z nasienia wydobytego z organizmu mężczyzny po jego śmierci, którego czynności życiowe podtrzymywała aparatura medyczna, urodziło się w marcu 1990 r.

Na Politechnice Federalnej w Lozannie w Szwajcarii firma Anecova opracowała metodę *ane vivo*, która jest metodą pośrednią pomiędzy *in vivo* a *in vitro*. Metoda ta jest w użyciu dopiero od 2015 r. Proces zapłodnienia przebiega w *Anecova* – silikonowej, perforowanej kapsułce, która jest umieszczana w macicy kobiety na 24 godziny. W kapsułce są komórki jajowe i plemniki. Pozostałe etapy procedury przebiegają tak samo, jak w standardowej procedurze *in vitro*. W Polsce pierwsze dziecko poczęte tą metodą urodziło się w lipcu 2017 r., w klinice Gyncentrum w Katowicach.

Szacuje się, że do 2005 roku na świat przyszło ponad milion dzieci, do 2010 r. już około 4 milionów, zaś do 2017 – 6 milionów dzieci poczętych metodą *in vitro*. Techniki zapłodnienia pozaustrojowego, jak i towarzyszące im procedury, są nadal rozwijane, pojawiają się kolejne warianty tych metod.

Techniki sztucznego zapłodnienia

Techniki wspomaganego rozrodu są metodami leczenia objawowego niepłodności, czyli nie leczą jej przyczyn. Techniki te umożliwiają poczęcie i urodzenie dziecka w sytuacjach, w których innym sposobem nie jest możliwe po-

częście i urodzenie dziecka. Są one podejmowane często kosztem znacznego ryzyka dla matki, dziecka oraz dla późniejszych pokoleń. Ponadto w metodach *in vitro* odbywa się to kosztem niszczenia embryonów ludzkich, które w tej procedurze są produkowane w nadmiarze.

1. Techniki zapłodnienia *in vivo*

Sztuczne zapłodnienie wewnątrzustrojowe (sztuczna inseminacja; sztuczne unasiennienie) polega na podaniu przygotowanego laboratoryjnie nasienia męskiego do dróg rodnych kobiety. Nasienie może być przygotowywane bezpośrednio po pobraniu albo rozmrożone, jeśli było poddane wcześniej kriokonserwacji. Warunkiem powodzenia inseminacji jest u kobiety prawidłowa macica, co najmniej jeden drożny jajowód, ze zdolnym do uwolnienia prawidłowych komórek jajowych jajnikiem, zaś u mężczyzny obecność w nasieniu plemników zdolnych dotrzeć do komórki jajowej. Skuteczność inseminacji wynosi 5% – 20% na cykl.

Inseminację stosuje się w przypadkach niepłodności spowodowanych: czynnikiem szyjkowym, immunologicznym, wrodzonymi lub nabytymi wadami narządów rozrodczych kobiety lub mężczyzny, które uniemożliwiają współżycie seksualne, nieprawidłowościami nasienia, impotencją. Inseminacja umożliwia pominięcie śluzu szyjkowego, który może być barierą nie do przebycia dla plemników o mniejszej żywotności. Unasiennienie jest też stosowane po leczeniu niepłodności męskiej, w przypadku uzyskania nasienia nieprawidłowego, które nie jest w stanie zapłodnić komórkę jajową po naturalnym współżyciu. Inseminację heterologiczną stosuje się wówczas, gdy kobieta jest płodna, a mężczyzna jest bezpłodny, albo gdy jest zakażony chorobą weneryczną, która przenosi się przez nasienie. Zapłodnienie heterologiczne najczęściej jest wykonywane z użyciem nasienia kriokonserwowanego pochodzącego z banku nasienia.

W zależności od miejsca podania nasienia wyróżnia się cztery rodzaje inseminacji: ICI (*intracervical insemination*) – podanie do szyjki macicy, IUI (*intrauterine insemination*) – podanie do jamy macicy, DIP (*direct intraperitoneal insemination*) – podanie do jamy otrzewnowej, FSP (*fallopian tube sperm perfusion*) – podanie do jajowodu.

Inseminację wykonuje się po stwierdzeniu m.in.: niepłodnego albo w ogóle braku śluzu szyjki macicy, nieprawidłowej jej budowy, stwierdzeniu przeciwciał w śluzie lub płynie nasiennym, nieprawidłowych parametrów nasienia, zaburzeń ejakulacji nie poddających się leczeniu.

Inseminacja wykonywana jest w cyklu naturalnym albo stymulowanym. Stymulacja hormonalna powoduje uzyskanie większej liczby pęcherzyków Graffa. Zaleca się uzyskanie 2 albo 3 takich pęcherzyków. W razie uzyskania większej liczby pęcherzyków Graffa zaleca się odstąpienie od inseminacji albo aspirację nadmia-

rowych pęcherzyków pod kontrolą USG. Alternatywą jest możliwość przejścia do zapłodnienia pozaustrojowego *in vitro*. Plemniki w drogach rodnych kobiety są w stanie przeżyć do 80 godzin, komórka jajowa jest zdolna do zapłodnienia kilkanaście godzin po owulacji. Ważnym dla powodzenia inseminacji jest określenie czasu owulacji. Największe prawdopodobieństwo powodzenia ma miejsce wówczas, gdy inseminacja jest wykonana w czasie okołoowulacyjnym: 24-48 godzin od wykrycia LH (gonadotropiny) w moczu lub zwiększenia stężenia LH w surowicy. Nasienie do tej metody musi być przygotowane laboratoryjnie. Podanie świeżego nasienia jest błędem w sztuce, gdyż spowoduje bolesne skurcze macicy i inne powikłania.

Preparatyka nasienia ma na celu oddzielenie plemników od plazmy nasienia, oczyszczenie powierzchni plemników z substancji utrudniających zapłodnienie, rozpoczęcie kapacytacji (uzdatnienia) plemników, selekcji plemników. Obecnie do preparatyki nasienia stosuje się podłoża i inne odczynniki produkowane przez wyspecjalizowane firmy.

Stosuje się trzy metody preparatyki nasienia. Płukanie nasienia wykonuje się w próbówce poprzez dodanie 3-10 ml podłoża, najczęściej 3 części podłoża na 1 część nasienia. Następnie próbkę odwirowuje się z przyspieszeniem 300-400 G przez 5-10 minut. Górną warstwę się usuwa, pozostawiając 0,5 ml dolnej warstwy. Sposób ten oddziela komórki od plazmy, w dolnej warstwie pozostają żywe i martwe plemniki oraz inne komórki obecne w nasieniu. Po wymieszaniu tak spreparowane nasienie może być użyte do inseminacji.

Swim-up wykorzystuje zdolność plemników do migracji z nasienia do podłoża. W próbówce umieszcza się 1 ml upłynionego nasienia, na nie nakłada się 2 ml podłoża. Następnie umieszcza się próbkę w inkubatorze nagrzanym do temperatury 37°C na godzinę. Plemniki przemieszczają się z nasienia do podłoża. Po upływie tego czasu pobiera się z próbki 0,5-1 ml górnej warstwy, pobrany preparat może być użyty do inseminacji albo umieszcza się go w innej próbówce, dodaje się 2-3 ml podłoża i odwirowuje z przyspieszeniem ok. 300 G przez 5-10 minut. Po wirowaniu usuwa się górną warstwę, pozostawia się 0,5 ml najniższej warstwy z plemnikami. Po wymieszaniu można użyć spreparowane nasienie do inseminacji albo do zapłodnienia *in vitro*.

Inna możliwość to wirowanie w gradiencie gęstości. Na dnie próbki stożkowej umieszcza się 2 ml gradientu 80%, na niej umieszcza się 2 ml gradientu 40%, na tej warstwie umieszcza się nasienie w ilości 1-2 ml. Całość odwirowuje się z przyspieszeniem 300 G przez 20 minut. Po wirowaniu usuwa się dwie górne warstwy, pozostawia się dolną warstwę w ilości 0,3 ml. Dodaje się 3 ml podłoża, po czym odwirowuje się z przyspieszeniem 100-150 G. przez 5-10 minut. Po wirowaniu usuwa się górną warstwę, pozostawia się 0,3-0,5 ml dolnej warstwy. Po wymieszaniu można użyć spreparowanego nasienia do inseminacji albo zapłodnienia pozaustrojowego (IVF).

Do inseminacji można użyć nasienia spreparowanego po pobraniu, jak też nasienia kriokonserwowanego, które przed wykonaniem tej procedury jest rozmrażane.

Inseminacja IUI wykonywana jest w warunkach ambulatoryjnych. Pacjentka powinna przyjść na zabieg z pełnym pęcherzem. Cewnik, najlepiej miękki, wprowadza się do jamy macicy. Jeśli są trudności z wprowadzeniem cewnika to wprowadza się go pod kontrolą USG. Nie powinno się dotknąć końcem cewnika ściany macicy. Po wprowadzeniu cewnika podaje się za pomocą strzykawki spreparowane nasienie. Po nabraniu do strzykawki nasienia nabiera się trochę powietrza, co umożliwi wprowadzenie całego preparatu do macicy.

Inseminacja FSP polega na podaniu spreparowanego nasienia do jajowodu albo jajowodów. Istnieją dwie wersje tej metody. Starszą wersją, obecnie bardzo rzadko używaną, jest wprowadzenie cewnika pod kontrolą USG do jajowodu i podanie tam spreparowanego nasienia. Nowszą metodą jest wprowadzenie do macicy pod ciśnieniem 4-5 ml preparatu nasienia, a po nim 2-3 ml podłoża. Wymaga to użycia cewnika urologicznego Foleya lub uszczelnienia szyjki specjalnym wziernikiem. Obecnie są produkowane dedykowane do tej metody całe zestawy.

W obu metodach szanse na poczęcie są podobne, rutynowo stosuje się prostsze w wykonaniu IUI. Możliwe powikłania inseminacji to perforacja ściany macicy, zakażenia, krwawienia z szyjki macicy, ból, odruch z nerwu błędnego (utrata przytomności, hipotonia). Jeśli inseminacja była w cyklu stymulowanym to może wystąpić hiperstymulacja jajników, a więc ciąża mnoga.

Późniejszą techniką o zbliżonych wskazaniach jest przenoszenie gamet. Zasada jest podobna do inseminacji; jest to metoda bardziej inwazyjna. Procedura zaczyna się od stymulacji hormonalnej jajników celem uzyskania większej ilości komórek jajowych, po czym pobiera się komórki jajowe laparoskopowo albo pod kontrolą USG. Następnie komórki jajowe i wyizolowane z nasienia plemniki zostają podane do narządów rozrodczych kobiety. Wykonywane jest to za pomocą cewnika, przenosi się od dwóch do czterech komórek jajowych oraz plemniki. Zapłodnienie, podobnie jak w inseminacji, następuje w organizmie kobiety.

W zależności od miejsca i sposobu podania gamet istnieją różne metody przenoszenia gamet: GIFT (*Gamete Intrafallopian Transfer*) – przeniesienie gamet do jajowodu. Gamety są umieszczane w cewniku, pomiędzy płynami zawierającymi plemniki i komórki jajowe pozostawia się pęcherzyk powietrza. Gamety są wprowadzane do jajowodu. Zapłodnienie następuje w jajowodzie. TUFT (*Transuterine Fallopian Transfer*) – przezmaciczne, dojajowodowe przenoszenie gamet. Jest to metoda podobna do powyższej, cewnik jest wprowadzany przez macicę pod kontrolą USG. POST (*Peritoneal Oocyte Sperm Transfer*) – dootrzewnowe przenoszenie gamet, w tej metodzie gamety są wprowadzane pod kontrolą USG do jamy otrzewnowej. Zapłodnienie następuje w pobliżu ujścia brzuszego jajowodu. Dalej proces przebiega jak przy naturalnym zapłodnieniu. FREDI (*Fallopian Replacement of Eggs with Delayed Insemination*) – pobrane laparoskopem z jajników komórki jajowe przenoszone są do jajowodu, a plemniki podawane są do jamy macicy prze-

zpochwowo. Zapłodnienie następuje w jajowodzie. TOAST (*Transcervical Oocyte and Sperm Transfer*) – plemniki i komórki jajowe są jednocześnie wprowadzane do macicy przezpochwowo. Zapłodnienie następuje w macicy.

Z powyższego wynika, że inseminacja domaciczna jest techniką szeroko stosowaną od wielu lat w praktyce zmagania się z niepłodnością. Najczęstszymi wskazaniami za jej przeprowadzeniem jest czynnik szyjkowy, niepłodność idiopatyczna, czynnik męski oraz endometrioza I i II stopnia. Szansa na ciążę kliniczną wynosi 7,4-12,4% na jeden cykl.

2. Techniki zapłodnienia *in vitro*

Zapłodnienie pozaustrojowe IVF (*in vitro fertilization*) jest procedurą medyczną, podczas której pobiera się komórki jajowe od kobiety (niekoniecznie tej, która będzie nosiła ciążę, i niekoniecznie od tej, która będzie prawną matką dziecka) i nasienie od mężczyzny (niekoniecznie od tego, który będzie prawnym ojcem dziecka), po czym dokonuje się zapłodnienia komórek jajowych w laboratorium. Po zapłodnieniu hoduje się zarodki, z których część jest wszczepiana do macicy kobiety, która będzie nosiła ciążę. Jest to procedura wysoce inwazyjna dla kobiet, zarówno dla kobiety od której pobiera się komórki jajowe, jak i dla tej, która będzie nosiła ciążę. Może to być ta sama kobieta, jak też mogą to być różne kobiety.

U kobiety, od której będą pobrane komórki jajowe, wykonuje się farmakologiczną stymulację jajników, aby wymusić dojrzewanie więcej niż jednej komórki jajowej w cyklu. Jest stosowanych kilka protokołów stymulacji, które różnią się czasem trwania – protokoły krótkie i długie, stosowanymi lekami, wskazaniami do zastosowania, skutkami ubocznymi.

Protokoły krótkie polegają na tym, że od pierwszego dnia cyklu podaje się antagonistę gonadoliberyny w celu zablokowania produkcji przez przysadkę mózgową hormonów FSH (folitropina) i LH (gonadotropina). Trzeciego dnia podaje się syntetyczne gonadotropiny, które pobudzają jajniki do wzrostu i do dojrzewania pęcherzyków Graffa. Proces jest monitorowany ultrasonograficznie oraz poprzez okresowe badania laboratoryjne stężenia hormonów we krwi. Dawki leków są dobierane na podstawie wyników badań. Po osiągnięciu właściwej wielkości pęcherzyków jednorazowo podaje się gonadotropinę kosmówkową celem wymuszenia owulacji.

Protokoły długie różnią się od krótkich dłuższym podawaniem antagonisty gonadoliberyny celem desensibilizacji przysadki mózgowej. Desensibilizacja to jest uniewrażliwienie przysadki mózgowej wskutek podawania hormonów z zewnątrz, co powoduje czasowe zmniejszenie jej aktywności. Desensibilizację uzyskuje się po 3-11 tygodniach. Po tym czasie podaje się syntetyczne gonadotropiny w celu wymuszenia owulacji. W ten sposób uzyskuje się kilka do kilkunastu dojrzałych pęcherzyków Graffa. Po stymulacji jajników pobiera się komórki jajowe wykonując punkcję jajników

pod kontrolą USG, w znieczuleniu ogólnym albo miejscowym. Iglą punkcyjną pobiera się płyn pęcherzykowy, w którym są zawieszone komórki jajowe. Od mężczyzny pobiera się nasienie, najczęściej poprzez masturbację. Jest ono preparowane podobnie jak do inseminacji domacicznej. Jeśli w nasieniu nie ma zdolnych do zapłodnienia plemników to pobiera się je metodą TESE (*testicular sperm extraction*) – pobranie chirurgiczne plemników z jądra, albo metodą PESA (*percutaneous epididymis sperm aspiration*) – pobranie plemników z jądra poprzez przezskórną punkcję igłową.

Po pobraniu i przygotowaniu komórek jajowych i nasienia ma miejsce zapłodnienie pozaustrojowe, które może być wykonane na kilka sposobów. Pierwszy sposób polega na umieszczeniu w pożywce komórek jajowych i plemników. Naczynie z podłożem i gametami umieszcza się w inkubatorze, w którym panują kontrolowane warunki. Kontrolowana jest temperatura i skład atmosfery w inkubatorze. Zapłodnienie zachodzi podobnie do naturalnego, z tą różnicą, że pominięta jest naturalna selekcja plemników na odcinku pochwa – jajowód. Po około 18 godzinach bada się podłoże na obecność embrionów.

PZD (*partial zone dissection*) – nacięcie osłonki przejrzystej. Przygotowuje się komórkę jajową podobnie jak w metodzie ICSI. Nacina się osłonkę przejrzystą komórki jajowej, która jest pozbawiona wieńca promienistego. Tak spreparowaną komórkę jajową umieszcza się w podłożu z plemnikami. Dalej proces przebiega podobnie do wyżej opisanego. Wykonane nacięcie ułatwia wniknięcie plemników do komórki jajowej.

SUZI (*subzonal insemination*) – podotoczkowa iniekcja plemników jest to wstrzyknięcie kilku plemników pomiędzy otoczkę przejrzystą a błonę komórkową oocytu. Iniekcja pojedynczego plemnika nie zapewnia zapłodnienia.

Kolejną metodą jest ICSI (*intra cytoplasmic sperm injection*) – iniekcja plemnika do cytoplazmy komórki jajowej, która wymaga innego przygotowania gamet. Komórkę jajową pozbawia się wieńca promienistego poprzez jego rozluźnienie za pomocą enzymu hialuronidazy, po czym wykonuje się rozproszenie komórek wieńca poprzez aspirację komórki jajowej do pipet o coraz mniejszej średnicy, najmniejsza pipeta ma średnicę wewnętrzną 150 μm . Do tak przygotowanej komórki jajowej wstrzykuje się pojedynczy plemnik za pomocą mikropipety. Komórka w tym czasie jest unieruchomiona pipetą przytrzymującą. Odmianą tej metody jest IMSI (*intra-cytoplasmic morphologically sperm injection*) – iniekcja morfologicznie wyselekcjonowanego plemnika do cytoplazmy komórki jajowej. Sama procedura przebiega tak samo jak ICSI, plemnik jest wybierany na podstawie jego cech morfologicznych.

Kolejną metodą jest AneVivo. Jest to metoda pośrednia pomiędzy metodami *in vitro* a metodami *in vivo*. Samo zapłodnienie zachodzi wewnątrz macicy, w AneCova – silikonowej, perforowanej kapsułce, w której umieszcza się plemniki i komórki jajowe, a kapsułkę umieszcza się w macicy kobiety. Zapłodnienie przebiega w środowisku macicy, następuje wymiana płynów pomiędzy macicą a wnętrzem kapsułki,

która pozwala na komunikację zarodka z organizmem kobiety na poziomie fizjologicznym, co ma wpływ na zarodek oraz na organizm kobiety. Macica dostosowuje się do przyjęcia zarodka, proces implantacji przebiega łatwiej niż przy klasycznym *in vitro*. Po 24 godzinach kapsułka jest wyjmowana, embriony są wyjmowane z kapsułki.

We wszystkich tych metodach zapłodnione komórki jajowe umieszcza się w podłożu inkubacyjnym. Hodowla jest prowadzona aż do uzyskania od czterech blastomerów do stadium blastocysty, trwa od 2 do 6 dni.

Przed implantacją są wykonywane badania preimplantacyjne. Z ośmiokomórkowego zarodka pobiera się pipetą jedną lub dwie komórki. Badany jest kod genetyczny, na podstawie tych badań typuje się zarodki przeznaczone do implantacji. Te badania nie są tak skuteczne jak pierwotnie zakładano. Są one uzasadnione w przypadku nosicielstwa u rodziców biologicznych wad kodu genetycznego. W przypadku stwierdzenia wady genetycznej do implantacji wybierany jest inny zarodek. Badania na zwierzętach dowodzą, że pobieranie nawet pojedynczych komórek z zarodka ma negatywny wpływ na jego rozwój. Badania przeprowadzone na myszach wykazały u tych osobników, które powstały z zarodków poddanych biopsji blastomeru, zaburzenia metabolizmu oraz zachowania w dorosłym życiu. Ponadto stwierdzono trudności w implantacji w ścianę macicy. Stwierdzono też zaburzenia w aktywacji genów.

Prawdopodobieństwo zagnieżdżenia zarodka wynosi 10-20% przy implantacji zarodka mającego cztery blastomery, i 30-40% przy implantacji blastocysty. Badania na zwierzętach wykazały negatywny wpływ dłuższej hodowli i późniejszego przenoszenia zarodka do macicy. U osobników, które powstały z zarodków poddanych dłuższej hodowli, częściej występują zaburzenia układu krążenia, zaburzenia metaboliczne, zaburzenia zachowania i wady genetyczne. W trakcie hodowli zarodków kobieta jest przygotowywana farmakologicznie do ich wszczęcia.

Wszczęcia się od dwóch do czterech zarodków. U młodych kobiet wszczęcia się dwa zarodki, u starszych wszczęcia się cztery zarodki. Przed wszczęciem podaje się lek rozluźniający mięśnie macicy. Następnie wprowadza się cewnik pod kontrolą USG do macicy. Zarodki pozostawia się 10-20 mm od dna macicy. Wtłoczenie zarodków do macicy poprzez cewnik jest wykonywane strzykawką. Po wszczęciu zarodków podaje się progesteron celem ułatwienia implantacji zarodków w ścianę macicy. Implantacja następuje w ciągu 8-11 dni od wszczęcia.

Po upływie 2 tygodni od embriotransferu wykonuje się test ciążowy. Jeśli wynik testu jest pozytywny wykonuje się badanie USG. Badanie to pozwala stwierdzić ilość zagnieżdżonych zarodków i miejsce ich zagnieżdżenia. Dalej ciąża przebiega podobnie do naturalnej. Pozostałe, niewszczęczone embriony, najczęściej są zamrażane.

Wszczęcie większej liczby zarodków zwiększa ryzyko ciąży mnogiej. Ciąża mnoga jest uznawana za powikłanie procedury IVF. W przypadku stwierdzenia ciąży mnogiej i choroby genetycznej jednego z płodów czasami wykonuje się aborcję selektywną. Jedną z metod aborcji selektywnej jest iniekcja roztworu chlorku potasu

lub chlorku sodu, które powodują zabicie płodu przez zatrzymanie akcji serca. Jest to procedura niebezpieczna dla zdrowia i życia kobiety oraz dla pozostałych płodów. Jednym z powikłań tej procedury jest poronienie septyczne, które powoduje utratę całej ciąży, a także stanowi zagrożenie dla życia kobiety.

Kriokonserwacja polega na zamrożeniu komórek w ciekłym azocie. Komórki są do tego przygotowywane poprzez zastąpienie obecnej w nich wody krioprotektantami zdolnymi przenikać błony komórkowe. Krioprotektantami przenikającymi błony komórkowe są: dimetylosulfotlenek oraz glikole: etylenowy, propylenowy. Te krioprotektanty obniżają temperaturę krystalizacji wody wewnątrz komórki. Krioprotektantem nieprzenikającym błony komórkowej jest sacharoza. Sacharoza służy do zachowania równowagi osmotycznej. Są dwa protokoły mrożenia: powolny, oraz szybki zwany wityfikacją.

Protokół powolny (*slow freezing*) polega na kilkietapowym powolnym schłodzeniu komórek w obecności krioprotektantów. Komórki są inkubowane w rosnących stężeniach krioprotektantów. Po osiągnięciu docelowych stężeń roztwór z komórkami nabiera się do słomki, która jest schładzana z prędkością 1-2°C/min do osiągnięcia temperatury -6°C. do -7°C. Po osiągnięciu tej temperatury następuje inicjalizacja procesu krystalizacji poprzez dotknięcie do słomki zmrożonego narzędzia. Dalej następuje powolne schładzanie z prędkością 0,3-0,4°C/min do osiągnięcia temperatury -30°C do -70°C. Dalsze mrożenie polega na umieszczeniu słomki w ciekłym azocie.

Rozmrożenie jest prostszym procesem, polega na umieszczeniu słomki w wodzie o temperaturze 37°C i zmniejszaniu stężeń krioprotektantów. W zależności od rodzaju mrożonych komórek stosuje się różne składy krioprotektantów, różne temperatury graniczne pomiędzy kolejnymi etapami schładzania, różne prędkości schładzania.

Protokół szybki (wityfikacja) polega na szybkim mrożeniu, w jego wyniku ciecz przechodzi do stanu bezpostaciowego ciała stałego, podobnego strukturalnie do szkła. Nie następuje formowanie kryształów. Komórki przygotowuje się do mrożenia podobnie jak przy protokole wolnym, skład i stężenie krioprotektantów są inne. Następnie komórki są nabierane do cienkiej słomki, z dnem z tworzywa sztucznego. Słomki z komórkami zanurza się w ciekłym azocie.

Rozmrożenie polega na przenoszeniu słomki do roztworów sacharozy, o coraz większym stężeniu. Podobnie jak w poprzednim procesie użyte krioprotektanty i parametry procesu są zależne od rodzaju mrożonych komórek.

Po zamrożeniu słomki z komórkami są umieszczane w pojemniku z ciekłym azotem do przechowywania komórek.

Procedury kriokonserwacji zwiększają ryzyko śmierci mrożonych komórek i embrionów. Kriokonserwacja nie pozwala na nieograniczony czas przechowywania embrionów. Przechowywanie embrionów jest ograniczone do 5 lat, gdyż dłuższe przechowywanie powoduje skracanie telomerów, które też występuje w okresie życia człowieka. Skrócenie telomerów podczas przechowywania komórek ma wpływ na dalsze życie poczętych w ten sposób dzieci.

W różnych krajach są odmienne uregulowania prawne dotyczące maksymalnego czasu przechowywania kriokonserwowanych embrionów. W niektórych krajach brak jest uregulowań prawnych w tej kwestii, zaś w innych ten czas jest ograniczony. W prawie angielskim jest nakaz zniszczenia embrionów po 5 latach przechowywania. Kriokonserwacja nie jest bezpieczna dla życia i zdrowia embrionów. Wiele embrionów tej procedury nie przeżywa, a część z tych, które przeżywają, jest nieodwracalnie uszkodzona.

Zakończenie

Problem sztucznego zapłodnienia zasługuje na szczególną uwagę i rzetelną dyskusję. Jeżeli nawet nie tyle w odniesieniu do kwestii świadomego planowania rodziny, ale już na pewno w związku z naszym rozumieniem nauki i jej roli społecznej. W zetknięciu z powyższym problemem musimy bowiem podjąć poważną debatę na temat samego rozumienia etyki w badaniach naukowych, finansowania określonych projektów, naszych priorytetów badawczych czy wreszcie sensu i celów, które mają przyświecać naukowcom.

Wielu bezdzietnych małżonków nie stawia sobie pytania, czy to jest moralne; interesuje ich tylko to, czy medycyna współczesna umożliwi im posiadanie dziecka, którego pragną. Często nie mają oni pojęcia, na czym polega inseminacja czy metoda „in vitro”; oni po prostu chcą mieć dziecko. W przekonaniu, że jest to możliwe, utwierdzają ich artykuły w prasie, w poradnikach itd. A skoro jest to możliwe, to dlaczego nie wolno? Nie pytają w jaki sposób do tego dochodzi. Ważny jest rezultat – ich dziecko. Gdy po jakimś czasie uświadomią sobie, jaka jest odpowiedzialność za podjętą decyzję, wtedy najczęściej wszyscy, którzy zachęcali ich do podjęcia takiej decyzji, odchodzą. Opuszcza ich lekarz, nie interesują się ich problemami naukowcy. Pozostają sami.

Bibliografia

- Bartel H., *Embriologia medyczna. Ilustrowany podręcznik*, Warszawa 2009.
- Broś-Konopielko B., Czajkowski K., *Zastosowanie karbetocyny (PABAL) w krwawieniu z jamy macicy z powodu poronienia septycznego – opis przypadku klinicznego*, „Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia”, T. 6, 2013, z. 2, s. 107-110.
- Grzechocińska B., *Losy ciąży uzyskanych drogą wspomaganego rozrodu*, „Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia”, T. 3, 2010, z. 2, s. 132-135.
- Katolo A. J., *Contra in vitro*, Warszawa 2010.
- Kochański A., *Status biogenetyczny ludzkiego zarodka w dobie rozwoju biotechnologii*, [w:] *Wobec in vitro. Genetyczne, moralne, filozoficzne, teologiczne i prawne aspekty zapłodnienia pozaustrojowego*, red. J. Grzybowski, F. Longchamps de Bérier, Kielce 2017, s. 129-138.

- Marianowski P., *Leczenie niepłodności technikami wspomaganego rozrodu*, „Służba Zdrowia”, 2001, nr 78-79, s. 23-24.
- Marianowski P., *Zapłodnienie pozaustrojowe w leczeniu niepłodności*, „Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia”, T. 3, 2010, z. 2, s. 129-131.
- Marszelewski M., *Zapłodnienie post mortem nasieniem zmarłego męża jako przykład medycznie wspomaganego prokreacji*, „Adam Mickiewicz Law Review”, 2013, nr 2, s. 71-81.
- Morciniak P., *Moralne aspekty procedury zapłodnienia pozaustrojowego (in vitro)*, [w:] *Wobec in vitro. Genetyczne, moralne, filozoficzne, teologiczne i prawne aspekty zapłodnienia pozaustrojowego*, red. J. Grzybowski, F. Longchamps de Bérier, Kielce 2017, s. 47-77.
- Muszala A., *Sztuczne zapłodnienie*, [w:] *Encyklopedia bioetyki*, red. A. Muszala, Radom 2009, s. 428-435.
- Olczyk A., *Diagnostyka i metody leczenia niepłodności*, „Wiadomości Archidiecezji Częstochowskiej”, R. 85, 2011, nr 10-12, s. 93-98.
- Olczyk A., *Etiologia kobiecej i męskiej niepłodności*, „Wiadomości Archidiecezji Częstochowskiej”, R. 85, 2011, nr 10-12, s. 79-92.
- Olczyk A., *Moralność seksu w przestrzeni życia osobistego, małżeńskiego i rodzinnego*, Częstochowa 2016.
- Olczyk A., *Wokół „in vitro” – meandry moralności*, [w:] *Mój najmłodszy pacjent. Godność osoby ludzkiej – in vitro czy naprotechnologia?*, red. A. Kuliberda, W. Terlecka, Częstochowa 2012, s. 49-86.
- Orzeszyna J., *Teologiczno-moralny aspekt niepłodności w małżeństwie*, Kraków 2005.
- Radwan J., Krasieński R., Gruszczyński W., *Badanie nasienia*, [w:] *Niepłodność i rozród wspomagany*, red. J. Radwan, S. Wołczyński, Poznań 2011, s. 67-80.
- Radwan J., Radwan M., *Leczenie niepłodności męskiej*, [w:] *Niepłodność i rozród wspomagany*, red. J. Radwan, S. Wołczyński, Poznań 2011, s. 123-128.
- Radwan M., *Zapłodnienie pozaustrojowe*, [w:] *Niepłodność i rozród wspomagany*, red. J. Radwan, S. Wołczyński, Poznań 2011, s. 179-215.
- Radwan M., Radwan P., Kurzawa R., *Przebieg ciąży i dzieci urodzone po leczeniu niepłodności*, [w:] *Niepłodność i rozród wspomagany*, red. J. Radwan, S. Wołczyński, Poznań 2011, s. 321-331.
- Radwan P., *Inseminacja domaciczna*, [w:] *Niepłodność i rozród wspomagany*, red. J. Radwan, S. Wołczyński, Poznań 2011, s. 165-178.
- Radwan P., *Kriokonserwacja w rozrodzie wspomaganym*, [w:] *Niepłodność i rozród wspomagany*, red. J. Radwan, S. Wołczyński, Poznań 2011, s. 217-225.
- Sybilski A. J., *Historia odkrycia uhonorowanego 101. Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Początki zapłodnienia in vitro i transferu embrionów*, „Problemy Lekarskie”, 2011, t. 47, nr 1, s. 72-75.

- Wasilewski T., *Procedura in vitro – technika i konsekwencje*, [w:] *Wobec in vitro. Genetyczne, moralne, filozoficzne, teologiczne i prawne aspekty zapłodnienia pozaustrojowego*, red. J. Grzybowski, F. Longchamps de Bérrier, Kielce 2017, s. 17-45.
- Wróbel J., *Niepłodność i możliwości jej przewyciężenia z perspektywy bioetyki katolickiej*, „Symposium”, R. 21, 2017, nr 2, s. 115-138.
- Wróbel J., *Prokreacja technicyzowana – wyzwania etyczne*, „Roczniki Teologii Moralnej”, T. 1, 2009, s. 183-202.
- Zapart B., *Problemy oraz argumenty filozoficzne i etyczne w dyskusji nad metodą in vitro. Studium porównawcze wybranych stanowisk bioetycznych*, Katowice 2011.

Netografia

- AneVivo – *bardziej naturalne podejście do leczenia niepłodności*, [w:] <http://biotechnologia.pl/technologie/anevivo-bardziej-naturalne-podejscie-do-leczenia-nieplodnosci,16278> [dostęp: 28-04-2018].
- The AneVivo device*, [w:] <http://www.anecova.com/the-anevivo-device/> [dostęp: 16-04-2018].
- Sześcioro dzieci z AneVivo*, [w:] <https://www.pfm.pl/newsy/szescioro-dzieci-z-anevivo/1257> [dostęp: 28-04-2018].