

## ZAPŁODNIENIE POZAUSTROJOWE I BIOTECHNOLOGIA

**Andrzej Kochański**

*Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie*  
*Wydział Biologii i Nauk o Środowisku*  
akochanski@imdik.pan.pl

### Streszczenie

W 1978 r. przysłała na świat Louise Brown, pierwsze dziecko poczęte poza organizmem matki. Nie minęło jeszcze 40 lat od narodzin L. Brown, a na świecie urodziło się około 5 mln dzieci z zastosowaniem zapłodnienia pozaustrojowego (IVF). Technologia IVF rozwija się szybko. Obecnie poprzez zastosowanie nowoczesnych technik badań genetycznych możliwa i praktykowana jest selekcja zarodków ludzkich ze względu na genotyp. Zarodki „niezdolne do prawidłowego rozwoju” stają się surowcem, który wykorzystuje współczesna biotechnologia. Zakres manipulacji ludzkimi gametami i zarodkami stale się poszerza. Idea „dziecka leku” uzyskanego z zastosowaniem IVF urzeczywistniła się już w Europie.

Zapłodnienie pozaustrojowe (IVF) generuje wiele rodzajów zaburzeń genetycznych, począwszy od nieprawidłowej aktywności kluczowych dla rozwoju genów, poprzez rozpowszechnienie i wytwarzanie nowych mutacji, skończywszy na wrodzonych wadach rozwojowych. Po pierwszym etapie selekcji eugenicznej (na poziomie zarodka) przeprowadzana jest selekcja na etapie płodu (aborcja). U części dzieci, które „przemknęły się” przez sita eugeniczne (zarodek i płód) stwierdza się zwiększoną zapadalność na niektóre nowotwory (białaczka, nowotwory zarodkowe mózgu, wątroby, nerki), dochodzi do uszkodzenia układu krążenia. Odnotowano również zwiększenie częstości występowania niepełnosprawności intelektualnej. Ukazały się pierwsze prace (model zwierzęcy IVF), które świadczą o dziedziczeniu nieprawidłowości wywołanych przez IVF. W procesie uprzedmiotowienia, ludzki zarodek staje się produktem podlegającym ocenie jakości oraz „surowcem” współczesnej biotechnologii.

**Słowa kluczowe:** zapłodnienie pozaustrojowe, selekcja eugeniczna, zaburzenia genetyczne.

**Keywords:** in vitro fertilization, eugenic selection, genetic disturbances.

## 1. Zarodek ludzki – mikrokosmos czy grupa komórek?

Aktywność genów ludzkiego zarodka charakteryzuje się olbrzymim dynamizmem już na etapie zygoty. Na początku trzeba zaznaczyć, że są to procesy, które biologia rozwoju człowieka zaczyna dopiero poznawać. Już w pierwszych dniach rozwoju przez genom zarodka przechodzą fale metylacji i demetylacji. Innymi słowy do sekwencji regulatorowych genów przyłączane są i odłączane grupy metylowe. Metylacja genów świadczy o ich aktywności, jednak nie jest jedynym procesem biochemicznym, któremu podlega genom zarodka (Allison, 2009, s. 393-449). Specjalizacja funkcji komórek zarodka zaznacza się już na etapie kilku blastomerów. Wydaje się, że każdy z blastomerów ma wyznaczone miejsce w strukturze zarodka. Doświadczenia, w których próbowano zamienić jeden z blastomerów innym pochodzącym z innej lokalizacji zarodka ujawniły wysoki stopień specjalizacji blastomerów. Okazuje się, że zarodki, w których „podmieniono” zaledwie jeden blastomer, nie są zdolne do prawidłowego rozwoju (Piotrowska-Nitsche i in., 2005, s. 479-490). Niezwykle istotne jest matczyne i ojcowskie pochodzenie genów zarodka. W przypadku ssaków prawidłowy rozwój zarodka zawierającego wyłącznie matczyne geny (partenogeneza / dzieworództwo) nie jest możliwy. Okazuje się, że komórki jajowe wzbudzone do podziałów na drodze partenogenezy posiadają bardzo ograniczony potencjał rozwojowy, zwykle ich rozwój zostaje zahamowany w stadium blastocysty (Daughtry i Mitalipow, 2014, s. 290-298). Ludzki zarodek stanowi niezwykle wrażliwy samoorganizujący się system biologiczny, który jednak nie jest zdolny do całkowicie autonomicznego rozwoju. Prawidłowy rozwój ludzkiego zarodka przebiega bowiem w warunkach ciągłego oddziaływania ze środowiskiem, z którego otrzymuje on szereg impulsów, których natury w pełni nie znamy. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że na długo przed powstaniem zygoty plemniki wchodzą w złożone interakcje ze środowiskiem najpierw macicy, następnie jajowodu i wreszcie z komórką jajową. Zanim jeden z kilkudziesięciu milionów plemników rozpocznie szereg oddziaływań molekularnych z komórką jajową, dojdzie do interakcji plemników ze środowiskiem. Wykazano, że mutacje w genach kodujących receptory dla plemników zlokalizowane w ścianie jajowodu skutkują niepłodnością męską (Sánchez-Calabuig i in., 2014; Anifandis i in., 2014). Oznacza to, że proces naturalnego zapłodnienia komórki jajowej nie jest zjawiskiem fizykochemicznym, lecz ma charakter ściśle zdeterminowanej sekwencji zdarzeń molekularnych. Niezwykle interesującym zjawiskiem jest naturalna selekcja plemników, która jest „prowadzona” przez komórkę jajową, a której mechanizmy molekularne są tylko częściowo poznane (Anifandis i in., 2014). Jednym z bardziej interesujących procesów zachodzących we wczesnym okresie rozwoju zarodka jest krótkotrwała demetylacja tak zwanych transpozonów (dawna nazwa: skaczące geny), które są ruchomymi elementami genetycznymi. Dzięki procesowi metylacji transpozony tracą zdolność przemieszczania się w obrębie genomu, co stanowi swoiste zabezpieczenie dla genomu. Transpozon, który przypadkowo wbuduje się w gen, może doprowadzić do upośledzenia jego funkcji. Wiadomo, że niektóre z takich wad wrodzonych, jak wrodzone wady cewy

nerwowej, są zależne od nadmiernej aktywności jednej z klas transpozonów wywołanej hipometylacją DNA (Wang i in., 2010).

## 2. Metylacja DNA – regulator aktywności genów

Dzisiaj już wiadomo, że prawidłowa metylacja DNA odpowiada za szereg ważnych funkcji genomu człowieka.

Pierwszym i najważniejszym znaczeniem prawidłowej metylacji DNA jest prawidłowa aktywność genów (ekspresja genów). W dużym uproszczeniu metylacja sekwencji promotorowych genu sprawia, że staje się on nieaktywny, zostaje jakby zablokowany. Na różnych etapach rozwoju człowieka istnieje ściśle określony wzorzec metylacji genów. Można wręcz powiedzieć, że na wzór koncertu symfonicznego rozwój biologiczny człowieka polega na fantastycznie skoordynowanym procesie aktywności i wyciszenia poszczególnych genów. Pomimo, że w genomie człowieka znajduje się około 30 tysięcy genów, w poszczególnych tkankach ich aktywność jest bardzo zróżnicowana. Niektóre z nich ulegają ekspresji wyłącznie w motoneuronach rdzenia kręgowego, podczas gdy inne charakteryzuje aktywność konstytutywna we wszystkich tkankach. W dużym stopniu o aktywności (ekspresji genów) decyduje właśnie metylacja DNA.

Metylacja DNA w regionach tak zwanych sekwencji repetytywnych (powtarzalnych) odpowiada za prawidłowy przebieg podziału komórkowego (mitoza/mejoza), w którym musi dojść do niezwykle precyzyjnego rozejścia się chromosomów (Allison, 2009, s. 393-449). W doświadczeniu polegającym na zablokowaniu prawidłowej metylacji sekwencji repetytywnych DNA udowodniono, że w komórkach dochodzi do tak zwanej „katastrofy mejozycznej”, przejawiającej się chaosem w ułożeniu poszczególnych chromosomów w komórce (Bourc'his i Bestor, 2004). Od wielu lat wiadomo, że metylacja DNA decyduje o tak zwanym zjawisku imprintingu rodzicielskiego, który polega na różnej aktywności niewielkiej grupy genów w zależności od pochodzenia (rodzicielskie/matczyne) (Passarge, 2004, s. 398-399).

Metylacja DNA odpowiada wreszcie za aktywność ruchomych elementów genetycznych – transpozonów. To właśnie metylacja DNA odgrywa kluczową rolę w zablokowaniu tych genów. Innymi słowy poprzez metylację DNA genom jest zabezpieczony przed nieuprawnionym przemieszczaniem się genów w jego obrębie.

Na prawidłową metylację DNA mają wpływ zarówno czynniki endo- jak i egzogenne. Wśród czynników egzogennych należy wymienić dietę, wpływ środowiska, infekcje. Jednym z najsilniejszych czynników zaburzających prawidłową metylację DNA jest zapłodnienie pozaustrojowe (IVF/ART).

### **3. Diagnostyka preimplantacyjna i ART**

Selekcja zarodków przed implantacją do macicy to jedyny obecnie znany sposób na podniesienie efektywności ART/IVF.

Z tego względu diagnostyka preimplantacyjna zyskuje coraz bardziej na znaczeniu. W największym uproszczeniu z zarodka składającego się z kilku blastomerów pobiera się jeden, który posłuży do przeprowadzenia testów genetycznych. Nawet bardzo powierzchowna selekcja genetyczna zarodków, której celem jest eliminacja aberracji chromosomowych (dużych mutacji obejmujących chromosomy lub ich części) pozwala na podniesienie wydajności ART/IVF aż do 70% (Yang i in., 2012). Już w niedalekiej przyszłości należy spodziewać się implementacji technologii sekwencjonowania genomu ludzkiego do oceny ludzkich zarodków, co jak można się spodziewać bardzo znacznie poprawi wydajność ART/IVF. Diagnostyka preimplantacyjna wprowadza kolejną manipulację do technologii ART/IVF. Usunięcie jednej z kilku komórek zarodka (blastomerów) oznacza dezintegrację zarodka (przerwanie połączeń międzykomórkowych), zmianę struktury przestrzennej zarodka (symetria) oraz pozbawia zarodek jednej z już zróżnicowanych (poziom molekularny, ekspresja genów) komórek. Z uwagi na brak możliwości wykonania eksperymentów z ludzkim zarodkiem, jedynym rozwiązaniem jest wykorzystanie modelu zwierzęcego. W badaniach prowadzonych na myszach udowodniono, że w przypadku zwierząt rozwiniętych z zarodków pozbawionych jednego z blastomerów (diagnostyka preimplantacyjna) ujawniają się zaburzenia metaboliczne i zaburzenia zachowania (Sampino i in., 2014). Z uwagi na wykorzystanie modelu zwierzęcego (mysz) pełna ocena zaburzeń zachowania i zaburzeń psychicznych będących skutkiem zastosowania diagnostyki preimplantacyjnej jest niemożliwa.

### **4. Zapłodnienie pozaustrojowe i zaburzenia metylacji genomu człowieka**

Jednym z najlepiej zbadanych zaburzeń genetycznych w zapłodnieniu pozaustrojowym jest nieprawidłowa metylacja genów. Nieprawidłową metylację genów u dzieci urodzonych z zapłodnienia pozaustrojowego wykazano zarówno w skali mikro (pojedyncze geny) jak i makro (genom człowieka) (Kochanski i in., 2013). U zdrowych dzieci urodzonych z zastosowaniem zapłodnienia pozaustrojowego dochodzi do nieprawidłowej metylacji promotora jednego z genów odpowiedzialnych za plastyczność naczyń krwionośnych. Okazuje się, że na skutek tej nieprawidłowości już u płodu obserwuje się dysfunkcję naczyń krwionośnych, która nie podlega korekcie u małych sześciomiesięcznych dzieci (Valenzuela-Alcaraz i in., 2013). Dysfunkcja naczyń krwionośnych (nadmierna sztywność naczyń, predyspozycja do miażdżycy) jest ciągle obecna u dwunastoletnich zdrowych dzieci urodzonych z zastosowaniem IVF (Scherrer i in., 2012). Po przeniesieniu tych zaburzeń (poprzez ART/IVF) na model zwierzęcy udowodniono, że przy diecie bogatotłuszczowej czas życia takich

zwierząt jest skrócony o około 25% (Rexhaj i in., 2013). Od wielu lat hodowcy zwierząt borykają się z problemem tzw. large offspring syndrome [LOS], którego istotą jest przerost narządów wewnętrznych u zwierząt wyprodukowanych z zastosowaniem IVF. Okazało się, że LOS na poziomie molekularnym (metylacja genów) jest modelem zwierzęcym zespołu Beckwitha–Wiedemanna (BWS) u człowieka (Chen i in., 2013). Zespół BWS u dzieci urodzonych z zastosowaniem IVF występuje aż 9-krotnie częściej niż w populacji ogólnej. Jest to zespół, w którym dodatkowo obserwuje się zwiększoną podatność na niektóre nowotwory pochodzenia zarodkowego (nephroblastoma, hepatoblastoma). Istotą zespołu BWS są zaburzenia metylacji pewnych genów (hipometylacja) (Lim i in., 2009). Jakby odwrotnym zespołem do BWS jest zespół Silvera-Russella (SRS). Najważniejszą cechą urodzeniową zespołu SRS jest mała albo nawet bardzo mała masa urodzeniowa noworodków. U dzieci z SRS występują ponadto zaburzenia metaboliczne (hipoglikemia), wady budowy ciała (asymetria). I znów wykazano związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy zespołem SRS a zapłodnieniem pozaustrojowym (Cocchi i in., 2013). To bardzo interesujące, że od wielu lat medycyna reprodukcyjna boryka się z problemem małej (poniżej 2500 g) i bardzo małej masy urodzeniowej noworodków (poniżej 1500 g). Najprawdopodobniej jedną z przyczyn tego problemu jest nieprawidłowa metylacja genów. Nieprawidłową metylację genów w IVF obserwuje się na poziomie całego genomu. W licznych pracach wykazano, że nawet 800 genów noworodka urodzonego z zastosowaniem IVF ma nieprawidłową metylację. Są wśród nich bardzo ważne geny biorące udział w takich procesach jak rozwój, nowotworzenia czy przemiana materii (Katari i in., 2009).

## **5. Wrodzone wady rozwojowe i zapłodnienie pozaustrojowe**

Problematyka wrodzonych wad rozwojowych występujących u dzieci urodzonych z zastosowaniem zapłodnienia pozaustrojowego jest stosunkowo dobrze poznana. Już na początku nowego stulecia zaczęły ukazywać się w piśmiennictwie pierwsze dane epidemiologiczne dotyczące występowania wad rozwojowych u dzieci urodzonych z zastosowaniem zapłodnienia pozaustrojowego. W roku 2002 opublikowano dane dotyczące częstości występowania wrodzonych wad rozwojowych u dzieci urodzonych z zastosowaniem ART oparte na ocenie australijskiego rejestru wad wrodzonych. Po raz pierwszy w badaniach na dużej grupie badanej i kontrolnej wykazano, że odsetek dzieci z wrodzonymi wadami rozwojowymi po ART jest co najmniej dwukrotnie większy niż u dzieci poczętych w sposób naturalny i zbliża się do wartości 10% (Hansen i in., 2002). W kolejnych latach doskonalono metodologię zbierania danych. Opracowano również metaanalizy obejmujące wyniki opublikowane w pracach spełniających ostre wymagania recenzenckie. W największym liczebnie opracowaniu opartym na analizie występowania wad w populacji 14 krajów europejskich (5 mln urodzeń) wykazano, że w ostatnich latach obserwuje się systematyczny wzrost liczby wrodzonych wad rozwojowych

towarzyszących ciążyom mnogim dizygotycznym. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest wzrost liczby procedur ART w Europie obserwowany w ostatnich latach (Boyle i in., 2013). Również w metaanalizie potwierdzono zwiększony odsetek występowania wrodzonych wad rozwojowych u dzieci urodzonych z zastosowaniem ART (Wen i in., 2012). Obecnie wiadomo, że reprezentacja poszczególnych rodzajów wad wrodzonych występujących u dzieci urodzonych z zastosowaniem ART jest bardzo niejednolita. Dla przykładu skojarzenie/asocjacja wad rozwojowych VACTERL (wady kręgow, zarośnięcie odbytu, wady wrodzone serca, przetoka tchawiczo-przełykowa, wady nerek i kończyn) u dzieci urodzonych z zastosowaniem ART występuje 8-krotnie częściej niż w populacji dzieci poczętych w sposób naturalny (Zwink i in., 2013). W grupie wrodzonych wad rozwojowych serca na plan pierwszy wysuwa się wada złożona – tetralogia Fallota (Tararbit i in., 2013). W jednym z ostatnio publikowanych opracowań dotyczących wrodzonych wad rozwojowych u dzieci urodzonych z zastosowaniem ART w Kalifornii największą część stanowią wady układu moczowo-płciowego, wady narządu wzroku i wrodzone wady serca (Kelley-Quon i in., 2013). Jeśli uśrednimy występowanie wad wrodzonych u dzieci urodzonych z zastosowaniem ART to widać, że wad wrodzonych jest około 30-40% więcej niż w populacji ogólnej. W tym miejscu należy jednak bardzo wyraźnie zaznaczyć, że rejestry wad obejmują tylko wady powstałe po urodzeniu dziecka. Z pewnością w przypadku większości wad morfologicznych uchwytnych w badaniach prenatalnych (ultrasonografia, amniocenteza) dzieci są abortowane. Oznacza to, że prawdziwy odsetek występowania wad rozwojowych u dzieci urodzonych z in vitro jest znacznie wyższy niż ten podawany w piśmiennictwie. W niektórych populacjach (Iran) u 30% dzieci urodzonych z zastosowaniem ART występują wady wrodzone wymagające interwencji chirurgicznej (Kermani i in., 2011). Niektóre wady rozwojowe nie ujawniają się w pierwszych 12 miesiącach życia dziecka, stąd wydłużenie czasu obserwacji na przykład do 3 roku życia sprawia, że odsetek ujawnionych wad znacznie wzrasta. Nie ma najmniejszej wątpliwości, że zapłodnienie pozaustrojowe sprzyja powstawaniu wrodzonych wad rozwojowych. Dane liczbowe, którymi dysponujemy są znacznie zaniżone w stosunku do prawdziwych danych (diagnostyka prenatalna, aborcja, poronienia samoistne, brak obowiązku zgłaszania wad, brak odnotowania sposobu poczęcia dziecka w niektórych rejestrach wad wrodzonych, bardzo krótki czas obserwacji dzieci).

## **6. Szczyt technologii ART/IVF – modyfikacja genomu ludzkiego zarodka**

Jak dotąd możliwości modyfikacji genomu zarodka były bardzo ograniczone. Opracowano wprawdzie metodę modyfikacji/edytowania genów opartą o zastosowanie tak zwanych „nożyczek molekularnych”, jest to jednak metoda bardzo wymagająca technologicznie i nie znalazła ona szerszego zastosowania. Zespół kierowany przez dr Jennifer Doudna opracował metodę

modyfikacji genomu opierającą się na systemie wykorzystywanym przez bakterie (Sternberg i in., 2014). W największym uproszczeniu rzecz ujmując bakterie wyposażone są w system eliminacji obcego DNA, co ma na celu utrzymanie integralności genomu bakteryjnego i ochronę przed wbudowywaniem genomów innych organizmów (wirusy, bakteriofagi) do genomu gospodarza. Po wnikięciu obcych kwasów nukleinowych do komórki bakteryjnej, specjalny aparat złożony z białek i RNA rozpoznaje obcy kwas nukleinowy, po czym endonukleazy (Cas) przecinają obcy kwas nukleinowy degradując go na małe fragmenty. W ten sposób zdegradowane DNA wirusa/bakteriofaga nie stanowi już zagrożenia dla integralności genomu gospodarza. Jinek i współpracownicy opracowali system (oparty na systemie bakteryjnym), przy którego użyciu można zniszczyć każdy gen w genomie komórki eukariotycznej. Możliwe jest również usunięcie bardzo dużych regionów genomu (kilkadziesiąt tysięcy par zasad). System CRISPR-Cas9 jest bardzo prosty w zastosowaniu i jednocześnie niezwykle wydajny. W ujęciu terapeutycznym system CRISPR-Cas9 jest dedykowany do usuwania groźnych mutacji zlokalizowanych w genomie. W dużym uproszczeniu po wprowadzeniu endonukleazy Cas9 do konkretnego genu za pomocą tak specjalnie zmodyfikowanego RNA (gRNA) dochodzi do pęknięcia obydwu nici DNA. Podwójne pęknięcie DNA uruchamia wewnątrzkomórkowe systemy naprawcze, które naprawiają uszkodzony fragment. Przy naprawie DNA zostaje jednocześnie usunięta mutacja. System CRISPR-Cas9 jest bardzo wydajny w niszczeniu kilku genów jednocześnie, co dotychczas było w biotechnologii nieosiągalne. System CRISPR-Cas9 pozwala więc jednocześnie na tworzenie bardzo wyszukanych modeli zwierzęcych wielu chorób człowieka poprzez inaktywację licznych genów (Ma i in., 2014). Posługując się systemem CRISPR-Cas9 w modelu mysim hemofilii przywrócono prawidłową aktywność czynnika krzepnięcia IX (Li i in., 2011). Nieznane jest jednak bezpieczeństwo systemu CRISPR-Cas9. Nieznana jest jego specyficzność. Nie wiemy, czy endonukleazy Cas9 nacinają wyłącznie te geny, dla których były dedykowane. Nie znamy również dokładności systemów naprawczych DNA. Skutkiem naprawy DNA może być wprowadzenie dodatkowych mutacji w innych miejscach genomu. Nie wiemy, czy nieuprawniona (poza kontrolą) naprawa DNA nie wymknie się spod kontroli. Wreszcie nie należy zapominać o tym, że system CRISPR został wywiedziony z genomu bakteryjnego, który w porównaniu z genomem eukariotycznym jest bardzo prymitywny. Trudno porównywać genom bakteryjny z genomem człowieka. Genom bakteryjny jest jednak poznany znacznie lepiej niż ludzki. W rzeczy samej jesteśmy dopiero na początku drogi w poznawaniu funkcji genomu człowieka, choć jego struktura chemiczna została już odczytana. Nawet sami twórcy metody CRISPR-Cas9 ostrzegają przed stosowaniem jej w celu modyfikacji genomu człowieka w głośnym już liście moratoryjnym opublikowanym na łamach Science (Baltimore i in., 2015). Niestety, na świecie pojawiły się już pierwsze próby modyfikacji genomu ludzkich zarodków. Po raz pierwszy wyniki tych badań opublikowano w kwietniu 2015 r. Grupa badaczy z Uniwersytetu Guangzhou w Chinach przeprowadziła eksperymenty modyfikacji zapisu genetycznego w ludzkich zarodkach obciążonych mutacjami odpowiedzialnymi za wystąpienie beta-

talasemii (genetycznie uwarunkowana niedokrwistość). Eksperyment nie powiódł się. Oprócz bardzo niskiej wydajności eksperymentu w zarodkach pojawiły się bardzo niekorzystne mutacje dodatkowe (niepożądane) (Liang i in., 2015). Droga do modyfikacji ludzkiego genomu została otwarta na poziomie technologii. Trudno obecnie odnieść się do możliwych skutków tak głębokiej ingerencji w strukturę ludzkiego zarodka. Prawdopodobnie jesteśmy obecnie w przededniu uzupełnienia technologii ART/IVF o modyfikację genomu. Wydaje się, że jest to najgroźniejszy dla człowieka moment w rozwoju tej technologii. Choć systemy prawne wielu krajów obecnie nie pozwalają na wprowadzanie jakichkolwiek zmian odziedziczalnych w genomie człowieka, to wydaje się, że przeforsowanie tych rozwiązań jest kwestią niedalekiej przyszłości.

## **7. Co przyniesie przyszłość?**

Pierwsze dziecko urodzone z zastosowaniem IVF przyszło na świat zaledwie 37 lat temu. Obecnie w Europie i Stanach Zjednoczonych ART prowadzone jest na wielką skalę (Gadzinowski i in., 2012). Obecnie w niektórych krajach już 4-5% dzieci rodzi się każdego roku z zastosowaniem ART. Jest to populacja bardzo młoda, większość to dzieci i młodzież, które nie weszły jeszcze w okres prokreacji. Pomimo ogromnej wiedzy dokumentującej negatywny wpływ ART/IVF na zdrowie człowieka, genom i epigenom technologia ART rozwija się coraz szybciej. Pojawiają się coraz bardziej wyrafinowane technologicznie metody ART. Wielkimi krokami zbliża się technologia modyfikacji jakościowej ludzkich zarodków (technologia CRISPR-Cas9). Selekcja eugeniczna zarodków jest faktem (diagnostyka preimplantacyjna wzbogacona o nowe techniki badania genomu). Zapłodnienie pozaustrojowe jest jedną z najbardziej rozwiniętych i dochodowych dziedzin współczesnej biotechnologii. Ludzkie zarodki „niezdolne do prawidłowego rozwoju” stają się surowcem do badań przemysłu biotechnologicznego. Technologia ART połączona z selekcją eugeniczną zarodków, kontrolą jakości, handlem, utylizacją „wybrakowanych egzemplarzy”, modyfikacją genomów jest rzeczywistością. Wszystkie manipulacje dotyczące ludzkiego zarodka i genomu mają negatywny wpływ na biologię tych niesłychanie złożonych systemów biologicznych. Można się spodziewać, że już w niedalekiej przyszłości obciążenie genetyczne populacji ludzkiej wywołane przez IVF/ART może być tak znaczne, że dojdzie do spadku płodności w skali całej populacji. Początkowo będzie to rekompensowane poprzez ulepszoną technologię ART. Wydaje się prawdopodobne (biorąc pod uwagę wyniki prac przeprowadzonych na modelu zwierzęcym), że płodność populacji może osiągnąć tak niski poziom, że nawet technologia ART przestanie być skuteczna.



## Bibliografia

- Allison L. (2009), Epigenetyka i monoalleliczna ekspresja genów, w *Podstawy biologii molekularnej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego 2009.
- Anifandis G, Messini C, Dafopoulos K, Sotiriou S, Messinis I. (2014), Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF). *Int J Mol Sci.* Jul 22;15(7):12972-97. doi: 10.3390/ijms150712972. Review
- Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M, Greely HT, Jinek M, Martin GS, Penhoet E, Puck J, Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR. (2015), Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* Apr 3;348(6230):36-8.
- Bourc'his D, Bestor TH. (2004), Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L., *Nature.* Sep 2;431(7004):96-9.
- Boyle B, McConkey R, Garne E, Loane M, Addor MC, Bakker MK, Boyd PA, Gatt M, Greenlees R, Haeusler M, Klungsoyr K, Latos-Bielenska A, Lelong N, McDonnell R, Métneki J, Mullaney C, Nelen V, O'Mahony M, Pierini A, Rankin J, Rissmann A, Tucker D, Wellesley D, Dolk H. (2013), Trends in the prevalence, risk and pregnancy outcome of multiple births with congenital anomaly: a registry-based study in 14 European countries 1984-2007. *BJOG.* May;120(6):707-16.
- Chen Z, Robbins KM, Wells KD, Rivera RM. (2013), Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics.* Jun;8(6):591-601.
- Cocchi G, Marsico C, Cosentino A, Spadoni C, Rocca A, De Crescenzo A, Riccio A. (2013), Silver-Russell syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a twin girl born after in vitro fertilization. *Am J Med Genet A.* Oct;161A(10):2652-5.
- Daughtry B, Mitalipov S. (2014), Concise review: parthenote stem cells for regenerative medicine: genetic, epigenetic, and developmental features. *Stem Cells Transl Med.* Mar;3(3):290-8.
- Gadzinowski J, Merritt TA, Jopek A, Kochański A, Lavery A, Merritt T. (2012), In vitro babies – medical and legal aspects, a European and North American perspective. *Biotechnologia;* 93(1): 9-26.
- Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. (2002), The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med.* Mar 7;346(10):725-30.
- Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, Gaughan JP, Coutifaris C, Sapienza C. (2009), DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet.* Oct 15;18(20):3769-78.

- Kelley-Quon LI, Tseng CH, Janzen C, Shew SB. (2013), Congenital malformations associated with assisted reproductive technology: a California statewide analysis. *J Pediatr Surg.* Jun;48(6):1218-24.
- Kermani RM, Zoljalali S, Kouhpayezadeh J, Nateghi MR, Shahzadehfazeli A, Nedaifard L. (2011), Evaluation of the growth process of infants conceived by assisted reproductive techniques at royan institute from birth to 9 months. *Iran J Pediatr.* Dec;21(4):449-54.
- Kochanski A, Merritt TA, Gadzinowski J, Jopek A. (2013), The impact of assisted reproductive technologies on the genome and epigenome of the newborn. *J Neonatal Perinatal Med.* 6(2):101-8. doi: 10.3233/NPM-1366812. Review.
- Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L, Murphy SL, Finn JD, Khazi FR, Zhou S, Paschon DE, Rebar EJ, Bushman FD, Gregory PD, Holmes MC, High KA (2011), In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature.* Jun 26;475(7355):217-21. doi: 10.1038/nature10177.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. (2015), CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell.* Apr 18. [Epub ahead of print].
- Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, Lam W, Oley C, Cole T, Brueton LA, Reik W, Macdonald F, Maher ER. (2009), Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.* Mar;24(3):741-747.
- Ma Y, Shen B, Zhang X, Lu Y, Chen W, Ma J, Huang X, Zhang L. (2014), Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9. *PLoS One.* 2014 Mar 5;9(3):e89413.
- Passarge E. (2004), Zaburzenia rodzicielskiego piętnowania genomowego w Genetyka Ilustrowany Przewodnik PZWL.
- Piotrowska-Nitsche K, Perea-Gomez A, Haraguchi S, Zernicka-Goetz M. (2005) Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development.* Feb;132(3):479-90.
- Rexhaj E, Paoloni-Giacobino A, Rimoldi SF, Fuster DG, Anderegg M, Somm E, Bouillet E, Allemann Y, Sartori C, Scherrer U. (2013), Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. *J Clin Invest.* 2013 Dec;123(12):5052-60.
- Sampino S, Zacchini F, Swiergiel AH, Modlinski AJ, Loi P, Ptak GE. (2014), Effects of blastomere biopsy on post-natal growth and behavior in mice. *Hum Reprod.* Sep;29(9):1875-83. doi: 10.1093/humrep/deu145. Epub 2014 Jul 15.
- Sánchez-Calabuig MJ, López-Cardona AP, Fernández-González R, Ramos-Ibeas P, Fonseca Balvís N, Laguna-Barraza R, Pericuesta E, Gutiérrez-Adán A, Bermejo-Álvarez P. (2014), Potential Health Risks Associated to ICSI: Insights from Animal Models and Strategies for a Safe Procedure. *Front Public Health.* Nov17;2:241. doi:10.3389/fpubh.2014.00241. eCollection 2014. Review

- Scherrer U, Rimoldi SF, Rexhaj E, Stuber T, Duplain H, Garcin S, de Marchi SF, Nicod P, Germond M, Allemann Y, Sartori C. (2012), Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *Circulation*. Apr 17;125(15):1890-6.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. (2014), DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. Mar 6;507(7490):62-7.
- Tararbit K, Lelong N, Thieulin AC, Houyel L, Bonnet D, Goffinet F, Khoshnood B. (2013), The risk for four specific congenital heart defects associated with assisted reproductive techniques: a population-based evaluation. EPICARD Study Group. *Hum Reprod*. Feb;28(2):367-74.
- Valenzuela-Alcaraz B, Crispi F, Bijmens B, Cruz-Lemini M, Creus M, Sitges M, Bartrons J, Civico S, Balasch J, Gratacós E. (2013), Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally. *Circulation*. Sep 24;128(13):1442-50.
- Wang L, Wang F, Guan J, Le J, Wu L, Zou J, Zhao H, Pei L, Zheng X, Zhang T. (2010), Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects. *Am J Clin Nutr*. May;91(5):1359-67.
- Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, Liu J, Hu Z. (2012), Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril*. Jun;97(6):1331-7.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, Salem RD. (2012), Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. May 2;5(1):24. doi: 10.1186/1755-8166-5-24.
- Zwink N, Jenetzky E, Hirsch K, Reifferscheid P, Schmiedeke E, Schmidt D, Reckin S, Obermayr F, Boemers TM, Stein R, Reutter H, Rösch WH, Brenner H, Ebert AK. (2013), Assisted reproductive techniques and risk of exstrophy-epispadias complex: a German case-control study. *J Urol*. Apr;189(4):1524-9.

## **Abstract**

### **In vitro fertilization and biotechnology**

In 1978 Louise Brown, a first child from in vitro fertilization (IVF) was born. At present 5 million children were born using IVF. The IVF technology develops very fast. Nowadays selection of the embryos due to their genotype is available. The embryos unable to develop normally are the biological “products” used by modern biotechnology industry. The spectrum of IVF-associated modifications becomes wider and wider. Idea of the Saviour Sibling has been implemented in Europe. IVF results in numerous genetic disturbances, beginning

from aberrant activity of the crucial genes through propagation and generation of new mutations – to congenital malformations. After a first step of eugenic selection (at the embryo level), the second step is eugenic selection of the fetuses (abortion). The newborns selected for further development have increased ratio of cancer (leukemia, hepatoblastoma, glioblastoma, nephroblastoma). Recently systemic and pulmonary vascular dysfunction was documented in the children conceived with IVF. In some papers an increased mental retardation frequency in IVF children was reported. The genetic disturbances resulting from IVF may be transmitted to the next generations, as was shown in the studies using laboratory animals. To summarize, a human embryo underlying quality-control starts to be material for quickly developing biotechnology.

#### **Nota o autorze:**

Andrzej Kochański, ur. 1971 r. w Gnieźnie. Absolwent Liceum Ogólnokształcącego im. Dąbrowki w Gnieźnie. W 1996 r. ukończył Wydział lekarski Akademii Medycznej w Poznaniu. Uzyskał specjalizacje lekarskie w zakresie genetyki klinicznej i laboratoryjnej genetyki medycznej. W 2015 r. uzyskał tytuł naukowy profesora nauk medycznych. Zainteresowania naukowe autora ogniskują się na neurogenetyce klinicznej i molekularnej. Autor kilkudziesięciu prac naukowych z zakresu neurogenetyki. Drugi nurt zainteresowań naukowych stanowi bioetyka. Od kilku lat zajmuje się genetyką zapłodnienia pozaustrojowego. Członek Zespołu Ekspertów ds. bioetycznych Konferencji Episkopatu Polski. Wykładowca genetyki na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym oraz Uniwersytecie Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie.