

Znaczenie procesów epigenetycznych w medycznie wspomaganey prokreacji

The role of epigenetics in medically assisted reproduction

Barbara Macura¹, Anna Strzępa², Marian Szczepanik²

¹Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum*, Wydział Nauk o Zdrowiu, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka, Kraków

²Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum*, Wydział Nauk o Zdrowiu, Katedra Biologii Medycznej, Kraków

Streszczenie

Problem niepłodności dotyka około 10–16% osób w wieku rozrodczym. Dla niektórych par jedyną możliwością posiadania własnego potomstwa jest skorzystanie z technik wspomaganego rozrodu (ARTs). Istnieją jednak doniesienia, że procedury te mogą wywoływać zmiany epigenetyczne w gametach i zarodku i wpływać na stan zdrowia dziecka. Procesy epigenetyczne polegają na zmianach w ekspresji genów bez równoczesnych zmian w kolejności zasad w DNA. Celem pracy jest przedstawienie możliwego wpływu ARTs na stan epigenetyczny zarodka i łożyska, a w konsekwencji na stan zdrowia przyszłego pokolenia.

Rozległe zmiany epigenetyczne zachodzą podczas produkcji gamet oraz na wczesnym etapie rozwoju zarodka. Techniki wspomaganego rozrodu są przeprowadzane tym samym czasie. Być może wykorzystywanie niedojrzałych gamet, stymulacja hormonalna jajników oraz warunki chemiczne i parametry fizyczne występujące podczas tych procedur mogą powodować nieprawidłowy profil zmian epigenetycznych w zarodku i łożysku. Istnieją doniesienia sugerujące, że w konsekwencji może to prowadzić nie tylko do wystąpienia typowych chorób związanych z zaburzeniami piętnowania genomowego (np. zespół Angelmana czy zespół Pradera–Williego), ale także do zwiększonego ryzyka rozwoju takich chorób, jak otyłość, cukrzyca, choroby układu sercowo-naczyniowego czy pewne zaburzenia neurologiczne.

Zmiany epigenetyczne mogą być przyczyną niepłodności, ale mogą również powstać w czasie stosowania ARTs. W przyszłości należy udoskonalić procedury wspomaganego rozrodu, tak aby nie powodowały zmian epigenetycznych w gametach i zarodku. Trzeba także odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu zmiany epigenetyczne są dziedziczne i wpływają na ryzyko rozwoju chorób w późniejszym życiu.

Słowa kluczowe: epigenetyka; techniki wspomaganego rozrodu (ARTs); niepłodność

Gin. Perinat. Prakt. 2021; 6, 1: 18–27

WSTĘP

Niepłodność definiowana jest współcześnie przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) jako niemożność zajścia w ciążę pomimo regularnego współżycia płciowego (3–4 razy w tygodniu), trwającego powyżej 12 miesięcy, bez stosowania jakichkolwiek środków zapobiegawczych. Obecnie problem

niepłodności dotyka około 10–16% osób w wieku rozrodczym [1, 2]. Około 20–30% przypadków niepłodności jest związana z czynnikiem męskim, 20–35% z czynnikiem żeńskim, 25–40% wiąże się z czynnikiem złożonym męsko-żeńskim; w 10–20% przypadków nie udaje się znaleźć przyczyny niepłodności [3]. Główne przyczyny niepłodności to schorzenia w obrębie układu rozrodczego, zaburzenia hormonalne oraz nieprawidłowości gene-

tyczne. Stan, w którym przyczyna schorzenia pozostaje nieznana, nazywamy niepłodnością idiopatyczną [1, 4].

Parom z niektórymi schorzeniami w obrębie układu rozrodczego oraz parom z niepłodnością niejasnego pochodzenia można zaproponować wykorzystanie technik wspomaganego rozrodu (ARTs, *assisted reproductive techniques*) w celu poczęcia własnego potomstwa. Obecnie w krajach rozwiniętych około 1–4% dzieci zostaje poczętych z wykorzystaniem ARTs, a w niektórych krajach, na przykład w Danii, współczynnik ten wynosi nawet około 6% [5]. Należy jednak podkreślić, że niepłodność idiopatyczna jest niepłodnością, której przyczyn wprawdzie nie znamy, ale jednak istnieją jakieś przeszkody natury biologicznej w prawidłowym przebiegu zapłodnienia i rozwoju zarodka. Otwarte pozostaje pytanie, jaki jest ich charakter i – co niezwykle istotne – w jaki sposób mogą one wpływać na zapłodnienie, rozwój zarodka oraz zdrowie dziecka, a może i następnymi pokoleń [1, 6–8].

Jedną z postulowanych przyczyn niepłodności idiopatycznej są zmiany epigenetyczne w gametach, uniemożliwiające lub utrudniające zapłodnienie i rozwój zarodka. Epigenetyka opisuje zjawiska związane ze zmianami w ekspresji genów, które jednak nie są wywołane zmianami w sekwencji zasad w DNA. Modyfikacje epigenetyczne obejmują takie zjawiska molekularne, jak metylacja DNA, modyfikacje histonów i struktury chromatyny oraz działanie niekodujących cząsteczek RNA. Procesy te doprowadzają do specyficznych i zróżnicowanych wzorców ekspresji genów w komórkach. Jak powszechnie wiadomo, za wytworzenie określonego fenotypu odpowiadają geny i środowisko, jednak to właśnie dzięki modyfikacjom epigenetycznym genom jest do pewnego stopnia „plastyczny” i możliwe jest lepsze dopasowanie się organizmu do zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego [9, 10].

Najnowsze doniesienia wskazują, że sama procedura ARTs może powodować epimutacje w gametach i zarodku. O ile choroby genetyczne o podłożu epigenetycznym, jak na przykład zespół Angelmana czy zespół Pradera-Williego, są rzadko występującymi schorzeniami, o tyle coraz częściej pojawiają się pytania, w jaki sposób epimutacje mogą wpływać na ryzyko rozwoju w życiu dorosłym powszechnie występujących przewlekłych chorób cywilizacyjnych oraz na stan zdrowia przyszłych pokoleń [11–13].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat możliwego wpływu technik wspomaganego rozrodu na stan epigenetyczny zarodka i łożyska. Ponadto podjęto próbę przybliżenia ewentualnego oddziaływania zmian epigenetycznych w zarodku na stan zdrowia w późniejszym okresie życia i możliwość zwiększonego ryzyka rozwoju chorób, również tych zaliczanych do schorzeń cywilizacyjnych.

Epigenetyczne reprogramowanie podczas produkcji gamet i wczesnego rozwoju zarodka

Szybkie i rozległe zmiany w poziomie metylacji genomu są obserwowane zarówno na etapie produkcji gamet, jak i na początkowym etapie rozwoju zarodka.

Pierwotne komórki płciowe w czasie gametogenezy są przekształcane w haploidalne gamety, plemniki oraz oocyty. W czasie tego procesu dochodzi do gwałtownej demetylacji, a następnie ponownej metylacji komórek linii płciowej. W plemnikach stopień metylacji wynosi około 90%, a w oocytach około 40–50%. W oocytach metylacja zachodzi zwykle wewnątrz genów, w plemnikach zaś – pomiędzy genami [12, 14].

Okolo 80 genów u człowieka ulega imprintingowi rodzicielskiemu, choć w różnych publikacjach podawana liczba może się nieco różnić. Zjawisko to polega na wybiórczej ekspresji niewielkiej liczby genów tylko z allela matczynego lub tylko z allela ojcowskiego. Podstawą molekularną imprintingu są zmiany epigenetyczne. Część genów ulegających imprintingowi odgrywa kluczową rolę w rozwoju łożyska i zarodka, a także w rozwoju układu nerwowego i jego funkcjonowaniu po urodzeniu. Imprinting ojcowski jest ustanawiany wcześniej niż imprinting matczyny. W okresie około 36 godzin przed owulacją następuje około 15-procentowy wzrost metylacji wysp CG (skrót pochodzący od słów: cytozyna i guanina) w oocycie. Wyspy CG to regiony w genomie o podwyższonej liczbie dinukleotydów, zawierających jako zasady azotowe cytozynę i guaninę. Sugeruje się, że oocyty mogą być podatne na zmiany epigenetyczne bardziej niż plemniki [12, 14].

Po zapłodnieniu w zygocie dochodzi do masywnej demetylacji, przy czym genom ojcowski ulega demetylacji aktywnej, a genom matczyny – pasywnej (z wyjątkiem genów podlegających imprintingowi). W czasie powstawania plemników histony zostają wymienione na protaminy, co umożliwia ściślejsze upakowanie DNA. Po zapłodnieniu, protaminy zostają z powrotem wymienione na histony. Od chwili implantacji następuje stopniowy i zróżnicowany proces metylacji w różnych typach komórek zarodka [12, 14].

Wyniki prowadzonych badań wskazują, że zaburzenia płodności mogą być spowodowane zaburzeniami epigenetycznymi. Defekty metylacji zostały stwierdzone w plemnikach pochodzących z nasienia oligozoospermicznego. Częstość tych zmian była wyższa niż zaburzenia występujące u potomstwa. Sugeruje to możliwości autokorekty błędów epigenetycznych przez zarodek. Wyniki innych badań niepłodnych mężczyzn wykazały niewłaściwą wymianę histonów na protaminy oraz hipometylację promotorów niektórych genów. Wyniki badań obejmujących młodsze i starsze kobiety (granica wieku: 35. rż.) wskazują, że u kobiet starszych dochodzi do

obniżenia poziomu ekspresji około 800 genów w blastocystie [14].

Niektórzy autorzy sugerują, że dla powodzenia ARTs istotne znaczenie ma badanie plemników pod kątem stopnia ich metylacji oraz stosunku protamin 1 do protamin 2 (P1/P2) przed ich wykorzystaniem we wspomnianych procedurach. Inne doniesienia literaturowe sugerują, że użycie plemników z nieprawidłowym stosunkiem P1/P2 lub zaburzeniami w układzie histony-protaminy może być przyczyną niepowodzeń rozrodu za pomocą ARTs [10, 15].

Z drugiej jednak strony istnieją doniesienia, że wykorzystanie plemników od mężczyzn cierpiących na oligozoospermie, ze stwierdzonymi zaburzeniami epigenetycznymi, nie spowodowało żadnych rozpoznanych chorób u potomstwa. Jak już wspomniano, może to sugerować istnienie mechanizmów kompensacyjnych i naprawczych, uruchamianych przez zarodek i doprowadzających do nałożenia prawidłowego wzoru epigenetycznego [10, 15].

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że przeprogramowanie epigenetyczne w genomach gamet i zarodka pokrywa się czasowo z manipulacjami wykonywanymi w przebiegu ARTs, co stwarza ryzyko powstania epimutacji [11, 12].

Techniki wspomaganego rozrodu

Techniki wspomaganego rozrodu to grupa metod leczniczych, których celem jest ułatwienie bądź wręcz przeprowadzenie zapłodnienia, czyli połączenia plemnika i oocytu. Najczęstszymi wskazaniami do zastosowania ARTs są: niedrożność jajowodów, endometrioza, nieprawidłowe parametry nasienia, a także nieskuteczne leczenie niepłodności innymi metodami oraz niepłodność idiopatyczna [1, 6].

Wśród ARTs możemy wyróżnić wiele metod. Najczęściej wykorzystywane to: zapłodnienie *in vitro* z transferem zarodka (IVF-ET, *in vitro fertilization and embryo transfer*), mikroiniekcja plemnika do cytoplazmy oocytu (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*) oraz inseminacja domaciczna (IUI, *intrauterine insemination*). Metoda IVF składa się z kilku etapów. Pierwszym z nich jest terapia hormonalna, która ma na celu wywołanie hiperstymulacji jajników. Następnie przeprowadza się punkcję jajników i pobiera się z pęcherzyków jajnikowych płyn z oocytami, które umieszcza się w specjalnych odżywkach. Do szalki z pobranymi oocytami wprowadza się plemniki. W czasie ponownej inkubacji dochodzi do samoistnego zapłodnienia. Pomiędzy 2. a 5. dobą rozwoju zarodek wprowadza się do jamy macicy. Przebieg ICSI jest podobny do IVF, ale zapłodnienie jest dokonywane z wykorzystaniem technik mikromanipulacji. Wyselekcjonowany plemnik jest docytoplazmatycznie wprowadzany do wnętrza oocytu. W przypadku IUI do jamy macicy wstrzykuje się nasienie

partnera lub anonimowego dawcy. Warto zaznaczyć, że zarodki można zamrażać w ciekłym azocie, a następnie można je rozmrozić i przenieść do macicy (FER, *frozen embryo replacement*). Zamrożone zarodki mogą być również przekazane innej parze za zgodą rodziców [6, 16].

Techniki wspomaganego rozrodu pozwalają ominąć pewne bariery biologiczne, uniemożliwiające zapłodnienie w warunkach naturalnych. Należy jednak pamiętać, że ewentualne zaburzenia genetyczne, które normalnie zostałyby wyeliminowane z populacji poprzez niemożność rozmnażania się, zostaną przekazane potomstwu. Jak już wspomniano, nie można też wykluczyć, że sama procedura ARTs i sztuczne warunki rozrodu mogą powodować zaburzenia, między innymi w procesie modyfikacji epigenetycznych. Niezależnie od tego, czy to zaburzenia epigenetyczne były przyczyną niepłodności, czy zaburzenia te powstały podczas stosowania ARTs może się zdarzyć, że zmiany epigenetyczne, których istnienia i znaczenia nie jesteśmy świadomi, zostaną przekazane następnym pokoleniom [14, 15].

Mechanizmy, poprzez które techniki wspomaganego rozrodu mogą wywoływać epimutacje

Trzeba podkreślić, że same procedury ARTs stanowią sztuczne środowisko dla gamet, które podlegają manipulacjom. Warunki te znacznie się różnią pod względem biologicznym i chemicznym od warunków panujących fizjologicznie w drogach rodnych kobiety. Istnieje prawdopodobieństwo, że prawidłowe gamety w nieprawidłowym środowisku mogą ulegać nieprawidłowym procesom epigenetycznym, a więc to nie gamety są źródłem problemów epigenetycznych, a przebieg i warunki panujące podczas samej procedury ARTs. Innymi słowy, podczas manipulacji gametami lub zarodkami *in vitro* w czasie ich epigenetycznego reprogramowania dochodzi do utraty właściwego wzoru epigenetycznego. Ponieważ ARTs składają się z wielu etapów, należy przyjąć, że wszystkie etapy będą wywierały swój kumulatywny wpływ na ewentualne wystąpienie epimutacji w zarodku [12, 15, 17, 18].

Wykorzystanie niedojrzałych gamet

W ARTs czasem wykorzystuje się gamety nie w pełni dojrzałe, a więc takie, które nie przeszły całej drogi przeprogramowania epigenetycznego. W przypadku braku plemników w spermie można wykonać docytoplazmatyczną iniekcję plemnika pobranego z najądra (PESA, *percutaneous epididymis sperm aspiration*) lub docytoplazmatyczną iniekcję komórki haploidalnej, uzyskanej poprzez punkcję jądra (TESE, *testicular sperm extraction*) [6]. A zatem u mężczyzn nieprodukujących plemników można używać do zapłodnienia okrągłych spermatyd,

jąder okrągłych spermatyd lub spermatocytów II rzędu. Okazuje się jednak, że pewne zmiany epigenetyczne zachodzą dopiero w najądrzu, co może prowadzić do nieprawidłowości genetycznych w zarodku, związanych między innymi z nieprawidłowym wykształceniem centrosomu, brakiem czynników aktywujących oocyt lub zmianami w wymianie histonów na protaminy [19].

Superowulacja

W przypadku kobiet uzyskanie większej liczby oocytów do procedur ARTs jest związane ze stymulacją hormonalną jajników i pobraniem oocytów pod kontrolą badania ultrasonograficznego (USG). Stymulacja hormonalna stwarza możliwość zmian epigenetycznych w oocycie, trudno jednak jednoznacznie stwierdzić, że takie zmiany powoduje chociażby dlatego że ART składa się z wielu etapów i każdy z nich potencjalnie może być źródłem takich zmian. Należy zwrócić uwagę na fakt, że stosowane są różne procedury hiperstymulacji jajników, zróżnicowane pod względem używanych hormonów, podawanej dawki oraz schematu protokołu, co sprawia, że wyniki tych procedur nie są idealnie porównywalne, co w konsekwencji utrudnia ich analizę [1, 13, 20, 21].

Sugeruje się, że stymulacja hormonalna zaburza proces oogenezy poprzez zaburzenie tempa dojrzewania oocytów, selekcję oocytów niskiej jakości oraz zmianę aktywności enzymów biorących udział w reprogramowaniu epigenetycznym. To wszystko obniża jakość oocytów oraz ich potencjał rozwojowy, między innymi poprzez redukcję zdolności oocytów do reprogramowania podczas rozwoju zarodkowego [12, 19]. Stymulacja hormonalna sprawia, że rozwijają się oocyty z nieprawidłowościami epigenetycznymi, które w normalnych warunkach uległyby zniszczeniu [14]. Doświadczenia na myszach wskazują, że stymulacja hormonalna powoduje zmiany epigenetyczne w zarodku, łożysku i komórkach linii płciowej, prowadząc do międzypokoleniowego przekazywania epimutacji [12]. Inne wyniki badań wskazują, że owulacja indukowana powoduje zwiększenie liczby genów hipometylowanych w łożysku, ale nie w tkankach zarodka [22]. Doświadczenia na gryzoniach wykazały, że stymulacja hormonalna owulacji powodowała tworzenie nieprawidłowych morfologicznie zarodków przedimplantacyjnych, obniżenie potencjału rozwojowego blastocyst oraz opóźnienie w opuszczaniu osłonki przejrzystej przez blastocystę. Stwierdzono również opóźnienia w rozwoju płodu oraz obniżenie jego masy ciała. U ludzi stymulacja hormonalna była skorelowana z większą częstością zaburzeń chromosomowych zarodków i gorszym stanem zdrowia noworodka w okresie okołoporodowym. Nie jest jednak możliwe jednoznaczne odróżnienie wpływu stymulacji hormonalnej od wpływu zaburzeń płodności, które tę stymulację wymusiły. Istnieją też doniesienia sugerujące, że stymulacja hormonalna powoduje nieprawidłowości

w środowisku jajowodów i macicy, utrudniające optymalny rozwój zarodka [23]. Autorzy postulują następujące przyczyny zaburzeń w rozwoju zarodka po stymulacji hormonalnej: dopuszczenie do dalszych etapów dojrzewania oocytów nie w pełni prawidłowych, przedwczesna utrata kontaktu komórek ziarnistych z oocytem oraz owulacja nie w pełni rozwiniętych oocytów. Czynniki te mogą powodować niepełne przeprogramowanie epigenetyczne oocytu, a w konsekwencji niewłaściwą ekspresję genów i zaburzenia w rozwoju zarodka. Wyniki niektórych badań na zwierzętach potwierdzają niewłaściwy wzór metylacji w zarodku po stymulacji hormonalnej oocytów. Być może zmiany takie mogą być przekazywane nie tylko na następne pokolenie, ale także na kolejne pokolenia. Zmiany epigenetyczne mogą dotyczyć również genów ulegających imprintingowi, prowadząc do rozwoju określonych jednostek chorobowych [23].

W celu uniknięcia hiperstymulacji hormonalnej możliwe jest zastosowanie metody dojrzewania pozaustrojowego (IVM, *in vitro maturation*). W metodzie tej wykorzystuje się niedojrzałe oocyty, pobrane z małych pęcherzyków antralnych przed spontaniczną owulacją. Oocyty dojrzewają poza organizmem kobiety do stadium metafazy II podziału mejozy, a więc stadium osiąganego podczas fizjologicznej owulacji lub przy standardowym pobraniu oocytów do programu *in vitro*. Następnie przeprowadza się zabieg IVF lub ICSI oraz transfer zarodków. Co ważne, procedura ta pozwala na wykluczenie lub znaczne ograniczenie stymulacji hormonalnej jajników. Według dostępnych danych odsetek cięż urodzonych z zastosowaniem tej procedury jest jednak niższy niż w klasycznym programie *in vitro*. Także liczba zabiegów przeprowadzanych przy wykorzystaniu tej metody jest niższa w porównaniu z klasycznym programem *in vitro* [24].

Wyniki prac eksperymentalnych wskazują jednak, że oocyty dojrzewające *in vivo* mogą się charakteryzować innym wzorem epigenetycznym niż oocyty dojrzewające *in vitro*. Co ciekawe, dodanie komórek ziarnistych do hodowli doprowadziło do wytworzenia podobnego wzoru epigenetycznego w oocytach jak w przypadku oocytów dojrzewających *in vivo*. Obecnie manipulacje takie stosuje się tylko w celach eksperymentalnych [14].

Hiperstymulacja hormonalna może również spowodować zmiany w funkcjonowaniu doczesnej (błona śluzowa macicy w czasie ciąży). To z kolei może wywołać zmiany w jej receptywności i w konsekwencji zaburzenie prawidłowej implantacji zarodka [25].

Warunki środowiskowe panujące w czasie procedur ARTs

Procedury ARTs składają się z szeregu etapów i obejmują zapłodnienie w warunkach *in vitro*, hodowlę, biopsję zarodka w przypadku badań preimplantacyjnych oraz

transfer zarodka do macicy. Głównym celem badania preimplantacyjnego (PGT-A, *preimplantation genetic testing for aneuploidy*) jest ocena liczby wszystkich chromosomów obecnych w komórce pobranej z zarodka na wczesnym etapie jego rozwoju w czasie procedury *in vitro*. W ten sposób identyfikowane są zarodki z aneuploidią i jest możliwy wybór zdrowego zarodka do transferu. Źródłem epimutacji może się stać praktycznie każdy z etapów procedury ARTs. Wyniki badań wskazują, że zmiany w składzie odczynników i roztworów używanych podczas stosowania ARTs, a także zmiany w zakresie takich parametrów, jak: temperatura, zawartość tlenu, odczyn pH czy ilość światła, mogą spowodować nieprawidłową metylację w genach ulegających imprintingowi, a w konsekwencji zmiany w ekspresji genów oraz nieprawidłowy rozwój płodu [1, 12, 18, 20–22, 26–29]. Wpływ warunków środowiskowych na epimutacje jest w wielu badaniach rozpatrywany głównie w kontekście genów ulegających imprintingowi. Wydaje się, że warunki środowiskowe mogą wpływać na epimutacje w łożysku i mają charakter w dużym stopniu przypadkowy – to znaczy, że nie wszystkie zarodki i nie wszystkie *loci* w równym stopniu ulegają temu procesowi [12]. Inne doniesienia sugerują możliwy wpływ hodowli zarodka na urodzeniową masę ciała noworodka. Ponadto czas hodowli ma być skorelowany z częstością porodów przedwczesnych, a także częstością pojawiania się bliźniąt monozygotycznych [30].

Nie bez znaczenia mogą też być zamrażanie i rozmrażanie zarodków. Wyniki badań wskazują, że dzieci urodzone przy wykorzystaniu zamrożonych wcześniej zarodków charakteryzują się podwyższoną masą ciała podczas narodzin. Może to być uwarunkowane zmianami epigenetycznymi w obrębie jednostki płodowo-łożyskowej. Otwarte pozostaje pytanie, jakie może to mieć znaczenie dla przyszłego zdrowia dziecka [8]. Pojawiają się również doniesienia sugerujące, że zamrażanie i odmrażanie embrionów nie wpływają znacząco na stan epigenetyczny zarodków. Być może za to zjawisko odpowiada w większym stopniu manipulacja embrionami *in vitro*, a nie sam proces zamrażania i rozmrażania zarodków [20]. Zamrożenie zarodków i ich wszczepienie w późniejszym czasie mogą umożliwić transfer embrionu w bardziej sprzyjającym hormonalnie środowisku [12]. Wyniki innych badań wskazują, że transfer świeżych zarodków do macicy jest skorelowany z podwyższonym ryzykiem niskiej urodzeniowej masy ciała oraz przedwczesnego porodu, natomiast transfer zarodków wcześniej zamrożonych – z podwyższonym ryzykiem nadmiernej masy ciała i stanu przedrzucawkowego [30]. Z kolei zamrażanie oocytów metodą witrifikacji przypuszczalnie nie wpływa na późniejszy rozwój zarodka [30], niemniej pewne badania wskazują na możliwość oddziaływania witrifikacji na ekspresję niektórych genów związanych

z ubikwitynacją [31]. Wydaje się, że oocyty poddane stresowi związanemu z witrifikacją mogą wykazywać zwiększoną wrażliwość na zmiany w obrębie epigenomu i transkryptomu [31].

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych na myszach wskazują, że zmiany w ekspresji genów u młodych osobników poczętych za pomocą różnych ARTs (IVF oraz ICSI) mogą się różnić [32]. W przypadku użycia techniki ICSI cały skomplikowany proces zapłodnienia zostaje ominięty dzięki docytoplazmatycznej iniekcji plemnika. Niektóre doniesienia wskazują na możliwość zwiększonej częstości aneuploidii, zwłaszcza chromosomów płci, u płodów poczętych tą techniką. Technika klasycznego IVF wydaje się bezpieczniejsza, ponieważ sam proces naturalnej fuzji gamet nie zostaje w tym przypadku pominięty. Niektóre badania wskazują też na osłabienie de kondensacji DNA plemnika po zapłodnieniu oraz obniżoną prędkość podziałów zarodka i „wykluwania” się z osłonki przejrzystej po ICSI w stosunku do IVF oraz zmienioną ekspresję niektórych genów ulegających imprintingowi. Ponownie pojawia się pytanie, czy to jest związane z samą procedurą, czy z wykorzystaniem w niej nieprawidłowej gamety [19].

Trzeba również pamiętać, że ciążę uzyskane w wyniku zastosowania ARTs często były ciążami mnogimi, co zawsze wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia powikłań niż w przypadku ciąży pojedynczej. Obecnie dąży się do uzyskiwania ciąż pojedynczych w procedurach ARTs. Powszechnie stosuje się transfer pojedynczego zarodka (SET, *single embryo transfer*). Również ciążę pojedynczą, uzyskaną dzięki ARTs, cechują się nieco większym ryzykiem powikłań ciążyowych, niż ciążę pojedynczą, uzyskaną drogą naturalnego poczęcia [1, 30].

Techniki wspomaganego rozrodu a epigenom łożyska

Od dawna znany jest fakt istnienia zjawiska imprintingu w łożysku. Geny ulegające ekspresji tylko u ojca nasilają transport substancji odżywczych do płodu, a geny aktywne tylko u matki ograniczają ten transport, co jest zgodne z hipotezą „konfliktu” rodzicielskiego [7]. Znaczenie imprintingu wyjaśnia się teorią sprzecznych interesów ojca i matki: ojcu zależy, aby wzrost płodu był jak największy (bo wtedy prawdopodobieństwo przeżycia dziecka jest większe, a kolejne dziecko może nie być już jego dzieckiem), matce zależy zaś na tym, by dziecko nie było za duże (gdyż w takiej sytuacji organizm matki nie będzie zbyt wyeksploatowany, aby urodzić kolejne dziecko, które i tak na pewno będzie jej dzieckiem). W efekcie rodzi się dziecko przeważnie „średniej” wielkości. Zjawisko imprintingu ma być molekularnym przekazywaniem tych instrukcji. Allele, które są wyciszane dzięki znacznikom epigenetycznym na chromosomie

ojcowskim lub matczynym, nazywamy allelami imprintowanymi (ojcowskimi lub matczynymi). Przykładem jest gen *IGF2* (*insulin growth factor*; insulinopodobny czynnik wzrostu 2), którego produkt białkowy promuje wzrost płodu. Allel ten ulega ekspresji na chromosomie ojcowskim i podlega imprintingowi na chromosomie matczynym [19].

Zmiany w tej epigenetycznej regulacji zostały wykazane pod wpływem działania wielu czynników środowiskowych, takich jak kontakt z metalami ciężkimi, otyłość czy aktywność fizyczna rodziców. Geny ulegające imprintingowi w łożysku mogą stanowić klucz do odpowiedzi na pytanie, jak czynniki zewnętrzne mogą wpływać na urodzeniową masę ciała dziecka. Imprinting może więc być mechanizmem, poprzez który dochodzi do zmian w transporcie substancji odżywczych w łożysku i – w konsekwencji – do nieprawidłowej urodzeniowej masy ciała dziecka. Takim specyficznym czynnikiem zewnętrznym może być stres, a czasem depresja, towarzyszące leczeniu niepłodności oraz procedurom ARTs. Wykazano, że stres zmienia imprinting łożyskowy, doprowadzając do zmian w ekspresji genów wpływających również na urodzeniową masę ciała [7]. Inne doniesienia wskazują na zmiany w metylacji genów w łożysku powstałym w wyniku zapłodnienia metodą ARTs w porównaniu z łożyskiem będącym efektem zapłodnienia przebiegającego w sposób naturalny [13, 26]. Dodatkowo profil metylacji w łożysku jest odmienny w łożyskach powstałych po zastosowaniu technik IVF/ICSI w porównaniu z łożyskami powstałymi przy wykorzystaniu technik mniej inwazyjnych, takich jak indukcja owulacji czy inseminacja wewnątrzmaciczna. Ponadto odzwierciedlenie w zmianach epigenetycznych łożyska znajdowały wiek ojca i męski czynnik niepłodności. Sugeruje to, że na ostateczny stan epigenetyczny łożyska wpływają zarówno przyczyna niepłodności, jak i zastosowana technika wspomaganego rozrodu. Autorzy zauważają, że większość łożysk może nie wykazywać tych zmian na skutek uruchomienia różnych mechanizmów kompensacyjnych, odwrócenia tych zmian, eliminacji komórek zmienionych lub naturalnej odporności na modyfikacje epigenetyczne [33].

Być może allele matczne i ojcowskie mogą się różnić podatnością na czynniki środowiskowe powodujące epimutacje. Jeśli epimutację można potraktować jako mutację recesywną, to druga epimutacja w allelu homologicznym może doprowadzić do ujawnienia specyficznego fenotypu. Taki proces zachodzi dopiero po pewnym czasie, co rodzi pytanie, czy efekty epimutacji nie ujawnią się dopiero w kolejnych pokoleniach [32].

Procesy epigenetyczne w łożysku obejmują także geny nieulegające procesowi imprintingu. Niewielkie nieprawidłowości w funkcjonowaniu łożyska mogą być spowodowane nieprawidłową inwazją trofoblastu. Może to być związane z leczeniem hormonalnym, koniecznym

między innymi do uzyskania odpowiedniej liczby dojrziałych oocytów, które może wywołać zmiany w receptywności doczesnej. Co więcej, jeśli dojdzie do rozwoju zarodka obciążonego zmianami epigenetycznymi, w łożysku mogą powstać adaptacyjne zmiany epigenetyczne, powodujące zmiany w transporcie substancji odżywczych do zarodka, rozwoju łożyska i jego ukrwienia, promujące dalszy rozwój zarodka i normalny rozwój ciąży. Pamięć epigenetycznych mechanizmów adaptacyjnych może jednak doprowadzić do rozwoju chorób metabolicznych w późniejszym okresie życia. Z kolei nasilone zmiany epigenetyczne w łożysku mogą ostatecznie doprowadzić do poronienia, stanu przedzrzuawkowego lub ograniczenia wzrastania płodu (FGR, *fetal growth restriction*) [25]. Reasumując, należy stwierdzić, że zmiany epigenetyczne towarzyszące początkowi rozwoju zarodka mają krytyczne znaczenie dla właściwego tworzenia łożyska. Zaburzenia tej regulacji podczas procedur ARTs mogą prowadzić do pojawienia się nieprawidłowości, również w obrębie łożyska [12].

Prawidłowe rozłożenie znaczników epigenetycznych w łożysku, zarówno wśród genów podlegających procesowi imprintingu, jak i tych, które mu nie ulegają, ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania łożyska. Przykładowo, u ludzi Banister i wsp. wykazali obecność około 22 *loci*, w których zmiany epigenetyczne były mocno skorelowane z ryzykiem wystąpienia FGR [34]. Wyniki wielu badań potwierdzają odmienny wzór epigenetyczny w łożyskach podchodzących z naturalnego poczęcia i łożyskach pochodzących z zapłodnienia z wykorzystaniem ARTs [35]. Inne badania wykazały, że poziom metylacji 23 genów wyjaśnia około 80% zmienności w masie ciała noworodka, a 6 spośród nich jest powiązanych z dalszym wzrostem [36]. Wyniki badań na zwierzętach wskazują, że ARTs powodują zmiany molekularne w łożysku, nawet w przypadku braku zaburzeń płodności [12, 37]. Przypuszcza się, że stosowanie ARTs jest skorelowane z występowaniem takich zaburzeń, jak: cukrzyca ciążowa, nadciśnienie tętnicze, stan przedzrzuawkowy, oddzielenie łożyska, poród przedwczesny, zahamowanie wzrostu wewnątrzmacicznego FGR, niska urodzeniowa masa ciała czy zwiększona śmiertelność okołourodzeniowa. Niewłaściwy imprinting łożyskowy może doprowadzić do wielu zaburzeń w rozwoju zarodka, a także niewłaściwego programowania metabolicznego płodu, które w okresie dorosłym może skutkować rozwojem chorób metabolicznych [12, 17, 36].

Interesujące są też wyniki badań wykazujące zależność pomiędzy ARTs a stopniem metylacji wysp CpG zlokalizowanych w promotorach 700 genów w łożysku oraz komórkach krwi pępowinowej, uzyskanych od dzieci poczętych metodami *in vitro* i *in vivo*. Badanie to wykazało hipometylację większości wysp CpG w łożyskach oraz hipermetylację wysp CpG w komórkach krwi pępowinowej u dzieci poczętych metodą *in vitro* w porównaniu z dziećmi poczętymi drogą naturalną. Geny te okazały

się związane z otyłością, cukrzycą typu 2 oraz nadciśnieniem tętniczym. Również wyniki innych badań wskazują na zależność pomiędzy poczęciem przy wykorzystaniu ARTs a występowaniem powikłań zdrowotnych w późniejszym okresie życia [15]. Do tych zaburzeń wstępnie zalicza się: nietolerancję glukozy, zmieniony profil lipidowy, wzrost zawartości i nieprawidłowe rozmieszczenie tkanki tłuszczowej, zaburzenia funkcjonowania tarczycy, nadciśnienie tętnicze oraz choroby układu sercowo-naczyniowego [8, 21, 36].

Badania zmian epigenetycznych w genach kandydatkich we krwi pępowinowej, krwi obwodowej i w łożysku wykazały znamienne różnice w genach *KvDMR1* oraz *H19/IGF2* wraz z regionem kontrolującym imprinting pomiędzy dziećmi poczętymi naturalnie i za pomocą ARTs. W przypadku wielu innych genów wyniki badań są sprzeczne, co może być związane z małą liczbą badanych tkanek. Badania inaktywacji jednego z chromosomów X u dziewczynek nie wykazały zaburzeń tego procesu. Niektóre eksperymenty wskazują, że geny *GNAS*, *PEG10*, *PRCP* i *RUNX3* ulegają zmianom epigenetycznym podczas procedur ARTs. Badania te jednoznacznie pokazują, że nie ma zgodności co do wpływu ARTs na pojawienie się epimutacji. Autorzy tłumaczą to między innymi brakiem standaryzacji warunków technicznych i biologicznych analiz, małą liczbą próbek w poszczególnych badaniach oraz naturalnie występującą przypadkowością w procesach biologicznych [12].

Wyniki badań na zwierzętach z wykorzystaniem zarodków pochodzących z procedury zapłodnienia *in vitro* wskazały na występowanie zespołu dużego potomstwa (LOS, *large offspring syndrome*) tylko u owiec i bydła. Objawy tego syndromu obejmowały: dużą wielkość i masę ciała potomstwa po urodzeniu, trudności w oddychaniu, niechęć do karmienia piersią i nagłą śmierć w okresie okołoporodowym. Niektóre literaturowe doniesienia sugerują, że za to zjawisko mogą odpowiadać utrata imprintingu i nadmierna ekspresja genu receptora IGF2 [15].

Schorzenia związane z genami ulegającymi imprintingowi a techniki wspomaganego rozrodu

Na szczególną uwagę zasługuje częstość występowania u dzieci poczętych za pomocą ARTs chorób związanych z zaburzeniami imprintingu genomowego. Do chorób z tej grupy zalicza się między innymi zespół Angelmana (brak aktywnej matczynej kopii w regionie 15q11-q13), zespół Pradera-Williego (brak aktywnej ojcowskiej kopii w regionie 15q11-q13), zespół Beckwitha-Wiedemanna (brak aktywnej matczynej kopii w regionie 11p15) oraz zespół Silvera-Russella (brak aktywnej ojcowskiej w regionie 11p15) [14, 19, 32]. Postuluje się również związek pomiędzy ARTs a zwiększoną częstością występowania retinoblastomy. Ogólnie zależność taka nie została jed-

noznacznie potwierdzona, niemniej nie została też jednoznacznie wykluczona. Wynika to najprawdopodobniej z faktu, że częstość tych chorób w populacji ogólnej jest bardzo niska (około 1:10 000–1:30 000, w zależności od choroby i cytowanego źródła). Z tego względu niezwykle trudno jest zebrać grupę kontrolną i badaną o odpowiedniej liczebności i sformułować jednoznaczne wnioski. Im rzadsza jest choroba związana z genem ulegającym imprintingowi, tym trudniej jest wykazać jej zwiększoną częstość w przypadku zastosowania procedur ARTs. Ponadto badania często nie uwzględniają takich czynników, jak wiek matki czy przyczyny niepłodności lub obniżonej płodności pary. Różnorodność protokołów ARTs utrudnia określenie wpływu tych metod na ryzyko wystąpienia choroby związanej z genem, który podlega imprintingowi. Nawet jeżeli ARTs zwiększają 3–10-krotnie ryzyko urodzenia dziecka z chorobą z grupy chorób związanych z imprintingiem, to nadal ryzyko to pozostaje stosunkowo niskie. Przyszli rodzice często są w stanie je zaakceptować, tym bardziej że ryzyko urodzenia chorego dziecka w populacji ogólnej wynosi około 2–4%. Obecnie najbardziej prawdopodobny jest związek pomiędzy ARTs a BWS [8, 10, 12, 19, 30, 38]. Hattori i wsp. potwierdzają zależność pomiędzy ARTs a wystąpieniem zespołu Beckwitha-Wiedemanna, ale również zespołów Pradera-Williego oraz Silvera-Russella. Pojawiły się także błędy metylacji w innych miejscach genomu. Autorzy przypuszczają, że błędy te wystąpiły raczej po zapłodnieniu, a nie w gametach [39].

Przyczyny molekularne schorzeń związanych z imprintingiem są zróżnicowane: mutacje chromosomowe (na przykład delecje), disomie jednorodzielskie (gdy oba chromosomy homologiczne pochodzą od jednego rodzica – matki lub ojca) lub utrata imprintingu (LOI, *loss of imprinting*). U urodzonych w wyniku zastosowania ARTs dzieci z tymi schorzeniami jako przyczynę choroby często stwierdza się LOI [19, 38].

Większość genów ulegających imprintingowi u ludzi ulega ekspresji wyłącznie na allelu matczynym, dlatego też bardziej prawdopodobne jest określenie tego typu zaburzenia jako pochodzącego od matki. Alternatywne wyjaśnienie zakłada, że genom matczynej może być bardziej podatny na błędy w imprintingu niż genom ojcowski. Jeszcze inna teoria zakłada, że o podatności na błędy imprintingu decyduje nie pochodzenie (matczyne lub ojcowskie), ale wrażliwość określonego *locus* [19].

Epimutacje spowodowane technikami wspomaganego rozrodu a stan zdrowia przyszłych pokoleń – wstępne wyniki badań

Litzky i Marsit oraz Berntsen i wsp. przedstawiają w swoich pracach interesujące spostrzeżenia, w których

sugerują, że grupę kontrolną dla pacjentek podlegających procedurze *in vitro* powinny stanowić kobiety, które pomimo problemów z zajściem w ciążę poczęły dziecko drogą naturalną, a nie kobiety, które nie zgłaszały żadnych problemów z płodnością i poczęły dziecko, oczywiście również drogą naturalną. Być może takie badania, zmniejszające udział tła genetycznego, wykazałyby rzeczywisty związek pomiędzy stanem zdrowia dzieci a zastosowaniem ARTs. Nie zmienia to jednak faktu, że poczęcie drogą naturalną, nawet po długim czasie, zawsze sugeruje, że zaburzenia genetyczne nie były tak poważne jak w przypadku par, które nigdy nie poczęły dziecka drogą naturalną [7, 30]. Badania dzieci, których rodzice doświadczyli problemów z poczęciem, ale nie korzystali z ARTs, wykazały, że dzieci te po urodzeniu wykazywały podobne zaburzenia jak dzieci urodzone przy użyciu ARTs, na przykład niską urodzeniową masę ciała. W przypadku badań rodzeństwa, w którym jedno dziecko zostało poczęte drogą naturalną, a drugie przy pomocy ARTs, brat lub siostra poczęci z wykorzystaniem tych technik cechowali się zwiększonym ryzykiem porodu przedwczesnego. Jakkolwiek niska masa ciała w czasie ciąży i niska urodzeniowa masa ciała występują częściej u dzieci, których rodzice mieli problem z naturalnym poczęciem lub korzystali z ARTs, to jednak wśród tych grup zaburzenia te są częstsze u dzieci poczętych przy użyciu ARTs. Wynika z tego, że same procedury *in vitro* stanowią czynnik ryzyka zaburzeń rozwojowych. Profil metylacji DNA może działać jak „sensor środowiskowy” – w hodowli *in vitro* profil ten może ulegać modyfikacji w stosunku do warunków *in vivo*. Można również stwierdzić, że ograniczona płodność i ARTs wywierają sumujący się wpływ na stan zdrowia noworodka [7, 35].

Inne badania obejmowały noworodki poczęte naturalnie (grupa kontrolna) oraz oraz noworodki poczęte z wykorzystaniem oocyty dawczyni lub oocyty autologicznego (grupy badane). Wydaje się, że rozwój zarodka z wykorzystaniem oocyty dawczyni może przebiegać z większą liczbą powikłań niż w przypadku użycia oocyty autologicznego lub spontanicznego zapłodnienia. Może to być spowodowane czynnikami immunologicznymi, czynnikami ograniczającymi płodność (na przykład zaawansowany wiek matki) lub procedurami ARTs [30].

Badano również poziom metylacji DNA wyizolowanego z krwi u noworodków i osób dorosłych (wiek 22–35 lat), podzielonych na grupy osób poczętych naturalnie i przy użyciu ARTs. Wyniki badania wskazują, że chociaż różnice w poziomie metylacji DNA u noworodków były wykrywalne, to u ludzi dorosłych ulegały zanikowi. Ograniczenie tego badania stanowi – zdaniem autorów – między innymi brak oszacowania, jak te małe różnice w metylacji DNA wpływają na poziom ekspresji genów oraz jak inne czynniki środowiskowe (na przykład leki,

palenie tytoniu czy spożywanie alkoholu) oddziałują na metylację DNA i korelują z wynikami badania [40].

Niedawne badania ukazujące zależność pomiędzy ARTs a zaburzeniami rozwoju u dzieci wykazywały możliwe związki z zaburzeniami w obrębie układu sercowo-naczyniowego, w tym z tetralogią Fallota, opóźnieniem rozwoju umysłowego, autyzmem oraz obniżonymi parametrami nasienia u młodych mężczyzn. Inne badania potwierdziły korelacje pomiędzy ARTs a spontanicznymi poronieniami, przedwczesnym oraz znacznie przedwczesnym porodem, niską oraz bardzo niską urodzeniową masą ciała, śmiertelnością okołourodzeniową, powikłaniami okołoporodowymi oraz wadami wrodzonymi. Otwarte pozostaje pytanie, czy bezpośrednim powodem tych problemów są zaburzenia epigenetyczne. Nie zmienia to faktu, że nie wszystkie analizy potwierdzają te zależności. Jako ewentualne powody tych rozbieżności autorzy wymieniają różne metody i protokoły ARTs, zróżnicowany stan zdrowia rodziców, małą liczebność grup badanych oraz zwiększoną liczbę ciąż mnogich po zastosowaniu ARTs. Ponadto niektóre schorzenia występują stosunkowo rzadko, stąd trudno jest uzyskać odpowiednią liczebnie grupę statystyczną. Stworzenie grupy kontrolnej z płodnych par poddających się ARTs nie jest praktykowane w przypadku ludzi. Z oczywistych powodów również zarodki uzyskane przy użyciu ARTs (mogące służyć do badań epigenetycznych) nie mają grupy kontrolnej, czyli embriionów uzyskanych drogą naturalnego zapłodnienia [7, 30].

Wpływ ARTs na stan zdrowia w postnatalnym okresie życia jest trudny do określenia. Pierwsze dziecko poczęte z wykorzystaniem ARTs, Louise Brown, przyszło na świat w 1978 roku. Populacja osób poczętych metodą *in vitro* jest jeszcze stosunkowo młoda. Obserwacje sugerują, że osoby te mogą być bardziej narażone na wystąpienie takich zaburzeń, jak: podwyższona masa ciała, insulinooporność, podwyższone stężenia glukozy i triacylogliceroli we krwi czy nadciśnienie tętnicze. Niska urodzeniowa masa ciała, która może towarzyszyć zapłodnieniu *in vitro*, zwiększa ryzyko śmierci noworodka, otyłości, chorób układu sercowo-naczyniowego i cukrzycy w późniejszym okresie życia. Zahamowanie wzrostu może być również skorelowane z występowaniem chorób neurologicznych oraz chorób nerek. Niektóre doniesienia wskazują też na obniżoną zawartość plemników w spermie mężczyzn poczętych metodą ARTs. W związku z wieloma wątpliwościami i brakiem dowodów na powyższe zależności autorzy pracy sugerują konieczność przeprowadzenia długoterminowych badań obejmujących dużą populację osób poczętych za pomocą ARTs [12, 13, 30]. Wiele genów ulegających imprintingowi odgrywa także znaczącą rolę w funkcjach neurologicznych [19, 35], dlatego też postuluje się, że występowanie chorób neurologicznych ma związek z ARTs. Wyniki badań wśród ludzi, dotyczą-

cych między innymi porażenia mózgowego i autyzmu, nie są jednak w tej kwestii jednoznaczne [13, 30].

WNIOSKI

Procedury ARTs są przeprowadzane w okresie okołozapłodnieniowym, a więc w czasie, kiedy dochodzi do reprogramowania epigenetycznego. Możliwe jest, że jakiegokolwiek zakłócenie naturalnych warunków w tym czasie zaburza naturalny przebieg modyfikacji epigenetycznych. Wydaje się, że aby uniknąć tego zjawiska, należy się maksymalnie zbliżyć do warunków fizjologicznych towarzyszących zapłodnieniu, na przykład stosować niskie dawki hormonów w celu stymulacji jajników, roz-

ważać możliwość użycia w ARTs płynów pobranych z dróg rodnych kobiety, a także bardziej precyzyjnie utrzymywać wartości temperatury, ciśnienia tlenu, wilgotności oraz innych parametrów podczas przeprowadzania procedur ARTs [35].

Scharakteryzowanie optymalnych parametrów zewnętrznych podczas procedur ARTs oraz określenie znaczenia zmian epigenetycznych w przypadku stosowania ARTs przypuszczalnie jeszcze przez długi czas będą stanowić pole badań dla lekarzy i naukowców.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Abstract

About 10–16% of adults in reproductive age suffer from infertility [1]. Assisted Reproduction Technology (ART) enables some of them to have own children. However, the influence of ART on the gamete and embryo epigenomes and subsequent health in adulthood is still under investigation. Epigenetics refers to change of gene expression without any modification of DNA sequences. The aim of this study is to analyse possible influence of ART on embryo and placenta epigenome, and health of future generation. The extensive epigenetic reprogramming occurs during gametogenesis and early embryo development. The ART is carried out in the same time. It is possible that abnormal changes of embryo and placenta epigenome could arise from the usage of immature gametes, ovarian hormonal stimulation and artificial, chemical and physical, conditions. Thus, the ART may cause the imprinting disorders (for example Angelman syndrome or Prader-Willi syndrom), as well the increased risk of obesity, diabetes, cardiovascular system disorders or neurological disturbances later in life. Current investigation indicates that the epigenetic disturbances could be the reason of infertility, moreover, ATR may cause the epigenetic disturbances. It is necessary to evaluate and modify the ART to avoid the epigenetic changes in gametes and embryo. We need to find answers to the following questions: the extent of epigenetic heredity and the influence of epigenetic changes on disease development.

Key words: epigenetics; assisted reproductive technology (ART); infertility

Gin. Perinat. Prakt. 2021; 6, 1: 18–27

Piśmiennictwo

- Łukaszuk K, Koziół K, Jakiel G, et al. Diagnostyka i leczenie niepłodności – rekomendacje Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRIe) oraz Polskiego Towarzystwa ekologów i Położników (PTGP). *Gin Perinat Prak.* 2018; 3: 112–140.
- Łepecka- Kl, Piłewska-Kozak A, Jakiel G. Niepłodność w świetle definicji choroby podanej przez WHO. *Med Og Nauk Zdr.* 2012; 18: 163–166.
- Das L, Parbin S, Pradhan N, et al. Epigenetics of reproductive infertility. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017; 9: 509–535, doi: [10.2741/s497](https://doi.org/10.2741/s497), indexed in Pubmed: [28410129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28410129/).
- Gunes S, Arslan MA, Hekim GN, et al. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33(5): 553–569, doi: [10.1007/s10815-016-0682-8](https://doi.org/10.1007/s10815-016-0682-8), indexed in Pubmed: [26941097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26941097/).
- De Geyter C. Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019; 33(1): 3–8, doi: [10.1016/j.beem.2019.01.004](https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.01.004), indexed in Pubmed: [30799230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30799230/).
- Piątek A, Koziarska-Rościszewska M. Wpływ in vitro i innych technik wspomaganego rozrodu na występowanie zaburzeń postnatalnych. *Nowa Pediatr.* 2013; 1: 10–18.
- Litzky JF, Marsit CJ. Epigenetically regulated imprinted gene expression associated with IVF and infertility: possible influence of prenatal stress and depression. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36(7): 1299–1313, doi: [10.1007/s10815-019-01483-0](https://doi.org/10.1007/s10815-019-01483-0), indexed in Pubmed: [31127477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31127477/).
- Pinborg A, Loft A, Romundstad LB, et al. Epigenetics and assisted reproductive technologies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2016; 95(1): 10–15, doi: [10.1111/aogs.12799](https://doi.org/10.1111/aogs.12799), indexed in Pubmed: [26458360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26458360/).
- Dada R, Kumar M, Jesudasan R, et al. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(3): 213–223, doi: [10.1007/s10815-012-9715-0](https://doi.org/10.1007/s10815-012-9715-0), indexed in Pubmed: [22290605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22290605/).
- Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril.* 2012; 97(2): 267–274, doi: [10.1016/j.fertnstert.2011.12.036](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036), indexed in Pubmed: [22289286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22289286/).

11. Zacchini F, Sampino S, Stankiewicz AM, et al. Assessing the epigenetic risks of assisted reproductive technologies: a way forward. *Int J Dev Biol.* 2019; 63(3-4-5): 217–222, doi: [10.1387/ijdb.180402gp](https://doi.org/10.1387/ijdb.180402gp), indexed in Pubmed: [31058298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31058298/).
12. Mani S, Ghosh J, Coutifaris C, et al. Epigenetic changes and assisted reproductive technologies. *Epigenetics.* 2020; 15(1-2): 12–25, doi: [10.1080/15592294.2019.1646572](https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1646572), indexed in Pubmed: [31328632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31328632/).
13. La Rovere M, Franzago M, Stuppia L. Epigenetics and Neurological Disorders in ART. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(17), doi: [10.3390/ijms20174169](https://doi.org/10.3390/ijms20174169), indexed in Pubmed: [31454921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31454921/).
14. Osman E, Franasiak J, Scott R. Oocyte and Embryo Manipulation and Epigenetics. *Seminars in Reproductive Medicine.* 2019; 36(03/04): e1–e9, doi: [10.1055/s-0039-1688801](https://doi.org/10.1055/s-0039-1688801).
15. Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, et al. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clinical Epigenetics.* 2015; 7(1), doi: [10.1186/s13148-015-0155-4](https://doi.org/10.1186/s13148-015-0155-4).
16. Ustawa z dnia 25 czerwca 2015 r. o leczeniu niepłodności. *Dz. U.* 2015 poz. 1087. isap.sejm.gov.pl.
17. Rhon-Calderon EA, Vrooman LA, Riesche L, et al. The effects of Assisted Reproductive Technologies on genomic imprinting in the placenta. *Placenta.* 2019; 84: 37–43, doi: [10.1016/j.placenta.2019.02.013](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.02.013), indexed in Pubmed: [30871810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30871810/).
18. Mani S, Mainigi M. Embryo Culture Conditions and the Epigenome. *Semin Reprod Med.* 2018; 36(3-04): 211–220, doi: [10.1055/s-0038-1675777](https://doi.org/10.1055/s-0038-1675777), indexed in Pubmed: [30866008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30866008/).
19. Laprise SL. Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev.* 2009; 76(11): 1006–1018, doi: [10.1002/mrd.21058](https://doi.org/10.1002/mrd.21058), indexed in Pubmed: [19484754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19484754/).
20. Jiang Z, Wang Y, Lin J, et al. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017; 44: 90–104, doi: [10.1016/j.bpobgyn.2017.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.07.004), indexed in Pubmed: [28844405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28844405/).
21. van Montfoort APA, Hanssen LLP, de Sutter P, et al. Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance. *Hum Reprod Update.* 2012; 18(2): 171–197, doi: [10.1093/humupd/dmr047](https://doi.org/10.1093/humupd/dmr047), indexed in Pubmed: [22267841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22267841/).
22. Wilkins-Haug L. Epigenetics and assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009; 21(3): 201–206, doi: [10.1097/GCO.0b013e32832d7b95](https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32832d7b95), indexed in Pubmed: [19458521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19458521/).
23. Marshall KL, Rivera RM. The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo. *Mol Reprod Dev.* 2018; 85(2): 90–105, doi: [10.1002/mrd.22951](https://doi.org/10.1002/mrd.22951), indexed in Pubmed: [29280527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29280527/).
24. Kyung SL, Soo JC, Chang WC, et al. In vitro maturation: clinical applications. *Clin. Exp Reprod Med.* 2013; 40: 143–147.
25. Choux C, Carmignac V, Bruno C, et al. The placenta: phenotypic and epigenetic modifications induced by Assisted Reproductive Technologies throughout pregnancy. *Clin Epigenetics.* 2015; 7: 87, doi: [10.1186/s13148-015-0120-2](https://doi.org/10.1186/s13148-015-0120-2), indexed in Pubmed: [26300992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26300992/).
26. Menezes Y, Dale B, Elder K. Time to re-evaluate ART protocols in the light of advances in knowledge about methylation and epigenetics: an opinion paper. *Hum Fertil (Camb).* 2018; 21(3): 156–162, doi: [10.1080/14647273.2017.1317846](https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1317846), indexed in Pubmed: [28438071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28438071/).
27. Sunde A, Brison D, Dumoulin J, et al. Time to take human embryo culture seriously. *Hum Reprod.* 2016; 31(10): 2174–2182, doi: [10.1093/humrep/dew157](https://doi.org/10.1093/humrep/dew157), indexed in Pubmed: [27554442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27554442/).
28. Ramos-Ibeas P, Heras S, Gómez-Redondo I, et al. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev.* 2019; 86(10): 1292–1306, doi: [10.1002/mrd.23119](https://doi.org/10.1002/mrd.23119), indexed in Pubmed: [30719806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30719806/).
29. Ménéz Y, Elder K. Epigenetic remodeling of chromatin in human ART: addressing deficiencies in culture media. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2020; 37(8): 1781–1788, doi: [10.1007/s10815-020-01884-6](https://doi.org/10.1007/s10815-020-01884-6).
30. Berntsen S, Söderström-Anttila V, Wennerholm UB, et al. The health of children conceived by ART: the chicken or the egg? *Hum Reprod Update.* 2019; 25(2): 137–158, doi: [10.1093/humupd/dmz001](https://doi.org/10.1093/humupd/dmz001), indexed in Pubmed: [30753453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30753453/).
31. Barberet J, Barry F, Choux C, et al. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clin Epigenetics.* 2020; 12(1): 121, doi: [10.1186/s13148-020-00911-8](https://doi.org/10.1186/s13148-020-00911-8), indexed in Pubmed: [32778156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32778156/).
32. Kohda T. Effects of embryonic manipulation and epigenetics. *J Hum Genet.* 2013; 58(7): 416–420, doi: [10.1038/jhg.2013.61](https://doi.org/10.1038/jhg.2013.61), indexed in Pubmed: [23739123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23739123/).
33. Choufani S, Turinsky AL, Melamed N, et al. 3D cohort study group. Impact of assisted reproduction, infertility, sex and paternal factors on the placental DNA methylome. *Hum Mol Genet.* 2019; 28(3): 372–385, doi: [10.1093/hmg/ddy321](https://doi.org/10.1093/hmg/ddy321), indexed in Pubmed: [30239726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30239726/).
34. Banister CE, Koestler DC, Maccani MA, et al. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. *Epigenetics.* 2011; 6(7): 920–927, doi: [10.4161/epi.6.7.16079](https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16079), indexed in Pubmed: [21758004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21758004/).
35. Canovas S, Ross PJ, Kelsey G, et al. DNA Methylation in Embryo Development: Epigenetic Impact of ART (Assisted Reproductive Technologies). *Bioessays.* 2017; 39(11), doi: [10.1002/bies.201700106](https://doi.org/10.1002/bies.201700106), indexed in Pubmed: [28940661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28940661/).
36. Chen M, Heilbronn LK. The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART). *J Dev Orig Health Dis.* 2017; 8(4): 388–402, doi: [10.1017/S2040174417000228](https://doi.org/10.1017/S2040174417000228), indexed in Pubmed: [28416029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28416029/).
37. Riesche L, Bartolomei MS. Assisted Reproductive Technologies and the Placenta: Clinical, Morphological, and Molecular Outcomes. *Semin Reprod Med.* 2018; 36(3-04): 240–248, doi: [10.1055/s-0038-1676640](https://doi.org/10.1055/s-0038-1676640), indexed in Pubmed: [30866011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30866011/).
38. DeAngelis AM, Martini AE, Owen CM. Assisted Reproductive Technology and Epigenetics. *Semin Reprod Med.* 2018; 36(3-04): 221–232, doi: [10.1055/s-0038-1675780](https://doi.org/10.1055/s-0038-1675780), indexed in Pubmed: [30866009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30866009/).
39. Hattori H, Hiura H, Kitamura A, et al. Association of four imprinting disorders and ART. *Clin Epigenetics.* 2019; 11(1): 21, doi: [10.1186/s13148-019-0623-3](https://doi.org/10.1186/s13148-019-0623-3), indexed in Pubmed: [30732658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30732658/).
40. Novakovic B, Lewis S, Halliday J, et al. Assisted reproductive technologies are associated with limited epigenetic variation at birth that largely resolves by adulthood. *Nature Communications.* 2019; 10(1), doi: [10.1038/s41467-019-11929-9](https://doi.org/10.1038/s41467-019-11929-9).