

Zapłodnienie *in vitro* z biologicznego punktu widzenia

Andrzej Max

Niepłodność występuje u wszystkich gatunków zwierząt, a także u ludzi, u których ma też ważny aspekt społeczny. Poza klasycznymi metodami leczenia niepłodności stosowane są w medycynie i weterynarii techniki wspomaganego rozrodu (assisted reproductive technologies – ART). Jedną z nich jest zapłodnienie pozaustrojowe. Problem zapłodnienia pozaustrojowego (extracorporeal fertilization, *in vitro* fertilization – IVF), zwłaszcza u ludzi, pojawia się lub powraca co jakiś czas przy okazji różnych wydarzeń politycznych, jak wybory, zmiany kadencji, postępowanie legislacyjne, obsady stanowisk. Bywa on też przedmiotem artykułów i audycji emitowanych przez konwencjonalne środki przekazu i portale internetowe, budząc zazwyczaj duże emocje i skrajne oceny. Wypowiadają się na ten temat politycy (będący z zawodu np. historykami, prawnikami, inżynierami, rolnikami, menedżerami), dziennikarze, duchowni, komentatorzy wydarzeń społecznych, psychologowie i etycy. Dyskusje między różnymi osobami o odmiennych poglądach są zażarte, a argumenty zwykle takie same, powtarzane dosłownie lub w nieco zmienionej wersji przez zwolenników poszczególnych opcji. W wypowiedziach dominują kwestie ideologiczne, natomiast wymiar biologiczny zagadnienia jest traktowany drugoplanowo, chociaż dyskutanci się nań powołują, wykorzystując jako podstawę własnej argumentacji. Często jednak tylko z pozoru te wypowiedzi są merytoryczne, bo ich autorzy uciekają się do ogólników, a gubią się w szczegółach, wykazując przy tym brak gruntownej wiedzy w tej dziedzinie. Nic w tym zresztą dziwnego, biorąc pod uwagę ich zawodowe przygotowanie, często odległe od nauk przyrodniczych w ogóle lub w szczególności od tak specyficznego zakresu tematycznego, jakim jest biologia rozrodu. Można zatem odnieść wrażenie, że nie zawsze wiedzą, o czym mówią. Celem tego artykułu jest przybliżenie niektórych biologicznych i medycznych aspektów zapłodnienia *in vitro* i krytyczne spojrzenie na procedury wspomaganego rozrodu na podstawie piśmiennictwa.

Terminologia

Współczesny język polski w wersji popularnej często korzysta ze skrótów. Dotyczy to także metody zapłodnienia *in vitro*, wprowadzonej w skrócie do samego określenia

in vitro z założeniem, że i tak wszyscy wiedzą, co ów zwrot określa. Należy jednak pamiętać, że ten termin łaciński oznaczający „w szkle” dotyczy różnych laboratoryjnych procedur pozaustrojowych, w tym niezwiązanych w ogóle z reprodukcją, w odróżnieniu od tych *in vivo*, czyli w żywym organizmie. Zbytne uproszczenia językowe mogą zatem niekiedy wprowadzać zamęt i powodować nieporozumienia. Tak też kiedyś było z tzw. metodami alternatywnymi, których znaczenie skrótowo zawężano niekiedy do określenia metod zastępujących doświadczenia na żywych zwierzętach, chociaż pojęcie to traktowane ogólnie jest o wiele pojemniejsze. W języku pisanim, zwłaszcza w piśmiennictwie fachowym, dla określenia zapłodnienia pozaustrojowego przyjął się skrót angielski IVE.

Biologia zapłodnienia

Zapłodnienie pozaustrojowe składa się z kilku podstawowych etapów, do których należą: pozyskiwanie gamet męskich i żeńskich, doprowadzenie gamet do zdolności zapłodnienia (dojrzewanie oocytów *in vitro*, kapacytacja plemników), połączenie oocytu z plemnikiem jako klasyczne IVF lub w drodze mikroiniekcji plemnika, do cytoplazmy oocytu, np. metodą ICSI (intracytoplasmic sperm injection), hodowla zarodków, przeniesienie (wprowadzanie) zarodków biorczyniom. Pozyskane gamety męskie i żeńskie podlegają ocenie, która wpływa na dalsze ich wykorzystanie lub postępowanie z nimi. Poszczególne etapy różnią się w ramach zróżnicowanych procedur. Niektóre z nich mogą być pominięte, jak np. dojrzewanie oocytów, które są uzyskane jako już dojrzałe – w stadium metafazy II podziału mejotycznego lub kapacytacja plemników przy ICSI.

Po zapłodnieniu powstaje zygota, która zawiera materiał genetyczny nowo powstałego organizmu, pochodzący w połowie od matki (z oocytu) i w połowie od ojca (z plemnika). Zygota dzieli się na blastomery, będące totipotencjalnymi komórkami macierzystymi, z których każda nie tylko jest wyposażona we właściwy gatunkowo i osobniczo zestaw chromosomów, ale ma zdolność do rozwoju w kolejny organizm oraz przekształcenia się w każdy rodzaj komórki. Zarodek jest zatem biologicznie osobnikiem swojego gatunku i to z większymi możliwościami rozwojowymi niż płód, noworodek czy organizm

The biological point of view on the *in vitro* fertilization process

Max A.

This article aims at the presentation of some important aspects of *in vitro* fertilization process. Assisted reproductive technologies and, among them, *in vitro* fertilization develop worldwide in animals as well in humans. They are associated with a number of physical and ethical problems. This critical review presents some chosen aspects of implemented procedures with the special emphasis of biological and medical risks and controversies. In particular, the handling of embryos, pathology of pregnancy and parturition and congenital abnormalities are discussed. In author's conclusion, procedures of *in vitro* fertilization can be safely used in animals, not in humans because of redundant risk and lack of biological benefit for the *Homo sapiens* species.

Keywords: reproductive technologies, animals, humans, *in vitro* fertilization.

dojrzały. W procedurach przenoszenia zarodków u zwierząt wykorzystywano między innymi ich połówki (po bisekcji), a nawet ćwiartki, z których część podejmowała rozwój jako pełny zarodek (1, 2).

Produkcja *in vitro* zarodków bydlęcych i świńskich jest mało efektywna w porównaniu np. do myszy. Między innymi wynika to z niedostatecznej wiedzy, szczególnie mechanizmów molekularnych zaangażowanych we wczesny rozwój zarodkowy zwłaszcza do czasu macicznego rozpoznania ciąży (3, 4). Spośród oocytów bydlęcych poddanych zapłodnieniu pozaustrojowemu uzyskuje się około 20% zarodków w stadium blastocysty. Po ich przeniesieniu do macic biorczyń utrzymuje się 50–60% ciąży. Wśród urodzonych cieląt zaznacza się niewielka przewaga buhajków (ok. 54%). Obserwuje się poronienia na poziomie 12–13%, a odsetek urodzonych żywych cieląt wynosi około 80. Wady wrodzone występują z nasileniem 3–4% (5). U bydła jednym ze sposobów postępowania jest wprowadzanie dwóch zarodków. Zwiększa to prawdopodobieństwo ciąży ogółem, ale w tym także ciąży bliźniaczej, która jest niepożądana u bydła mlecznego. W celu zwiększenia odsetka samic ciążarnych w procedurach przenoszenia zarodków (embryo transfer – ET) stosuje się niekiedy wprowadzanie zarodków biorczyniom unasiemionym uprzednio podczas rui. Takie postępowanie z przeniesieniem 1–2 zarodków z zapłodnienia pozaustrojowego biorczyniom innej rasy bydła spowodowało, że wśród cielnych biorczyń było 68% ciąży bliźniaczych (z unasiemienia i z przenoszenia), jednak 26% spośród nich poroniło, zaś 39% cieląt było martwo

urodzonych (6). Inne obserwacje wykazały, że cielęta po przeniesieniu zarodków pochodzące z IVF rodziły się cięższe niż po ET pochodzące z zapłodnienia *in vivo*. Było to powodem zwiększonego udziału trudnych porodów i w związku z tym ponaddwukrotnie większymi stratami okołoporodowymi (7). Potwierdza to wcześniejsze informacje o większej masie ciała, dłuższej ciąży i częstszych problemach porodowych przy ciążach z IVF w porównaniu do ciąż będących wynikiem sztucznego unasienniania. Jednocześnie wykazano po IVF niższą przeżywalność noworodków i ponadczterokrotnie wyższy udział wad wrodzonych (8, 9). Według innych badań iloraz szans dla każdej wady wrodzonej wynosił 1,42 (10).

Udział zarodków bydlęcych pochodzących z zapłodnienia pozaustrojowego systematycznie i znacznie wzrasta, jednak w dalszym ciągu około 2,5–3-krotnie więcej przenosi się zarodków powstałych *in vivo* i wypłukanych od dawczyń (11). Zarodki pochodzące z zapłodnienia pozaustrojowego mają gorszy potencjał rozwojowy w porównaniu do powstałych *in vivo*. U bydła około 90% oocytów uzyskanych z pęcherzyków jajnikowych dojrzewa *in vitro* do stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego (MII), zaś 80% zygot powstałych po IVF podejmuje podział na dwa blastomery, ale tylko 30–40% rozwija się do stadium blastocysty (11). U owiec po wprowadzeniu bioczyni dwóch zarodków z IVF uzyskano 54,3% ciąż w porównaniu do 90% po przeniesieniu dwóch zarodków pochodzących z zapłodnienia naturalnego. Także mrożenie zarodków metodą witrifikacji, zwłaszcza pochodzących z IVF, znacznie obniżało odsetek ciąż (12). Z kolei spośród 283 bruzdkujących zarodków kocih uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro*, 79 rozwinęło się do stadium blastocysty, a 39 do stadium wykluwającej się blastocysty (13).

Ocena zarodków i jej konsekwencje

Jednym z etapów zapłodnienia *in vitro* jest ocena zarodków mająca na celu wybór do przeniesienia bioczyniom tych, które dają największe prawdopodobieństwo kontynuowania rozwoju. Jednym z kluczy do określenia jakości zarodków bydlęcych jest ich ocena morfologiczna i zakwalifikowanie do jednego ze stopni: bardzo dobry (I), dobry (II), dostateczny (III), niedostateczny (IV) i martwy (V). Ocenie podlegają między innymi kształt, wielkość i kolor blastomerów, ich liczba (adekwatna do wieku), udział blastomerów uszkodzonych, występowanie ziarnistości (14, 15). Także u ludzi konwencjonalna ocena zarodków polega na badaniu (po krótkotrwałym wyjęciu z inkubatora) ich budowy

morfologicznej, charakterystycznej dla etapu rozwoju (czasu hodowli) – od stadium przedjądrzy, przez podziały na blastomery, do stadium blastocysty – i zaszeregowaniu do klas oznaczanych cyfrowo lub literowo. Taka ocena jest jednak bardzo subiektywna. Proponowana też jest sekwencyjna analiza zarodka przypisująca różnym cechom morfologicznym zależnym od wieku liczbę punktów, których suma wyraża jakość zarodka (16). Dodatkowo stosowane bywają badania genetyczne lub cytogenetyczne materiału pobranego biopsją z zarodków, która to metoda należy do inwazyjnych i może być szkodliwa. Jedną z nowoczesnych jest metoda „time-lapse” polegająca na śledzeniu zmian zachodzących w czasie hodowli bez potrzeby wyjmowania zarodka z inkubatora (17). Taka dynamiczna ocena z komputerową rejestracją obrazów ma być bardziej przydatna w oszacowaniu potencjału rozwojowego i przewidywaniu możliwości implantacyjnych zarodka po jego wprowadzeniu do macicy bioczyni. Stosowanie systemów wyposażonych w kamery do obserwacji zarodków ma zwiększać skuteczność procedur IVF (18). Aby zmniejszyć ryzyko uszkodzenia zarodka podczas oceny morfologicznej, poszukuje się także innych nieinwazyjnych metod, np. oznaczenie biomarkerów wskazujących na potencjał rozwojowy zarodków, w tym ludzkich i bydlęcych. Jednym z kierunków jest wykrywanie w pożywkach hodowlanych fragmentów RNA (mikro-RNA) i ich korelacji z możliwościami dalszego rozwoju zarodkowego (19, 20, 21).

Na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego bywają prowadzone, także u ludzi, badania genetyczne mające na względzie selekcję w kierunku płci lub wykrycie aberracji chromosomowych (22). Przedimplantacyjna diagnostyka genetyczna służy wykrywaniu aneuploidii w celu przenoszenia tylko zarodków euploidalnych (o prawidłowym składzie chromosomów), zwiększenia odsetka implantacji, zmniejszenia częstości ronień i zapobiegania urodzeniu dzieci z wadą (23, 24). Pozostaje jednak problem postępowania z zarodkami niezakwalifikowanymi do przeniesienia z tych powodów, jak również ze względu na ich niedostateczną jakość według oceny morfologicznej. W przypadku zarodków zwierzęcych są one niszczone, co natomiast dzieje się ze zdyskwalifikowanymi zarodkami ludzkimi, pozostaje zamknięte pomiędzy ścianami laboratoriów klinik leczenia niepłodności. Tymczasem okazuje się, że u ludzi zarodki uznane za „niskiej jakości” mogą mieć potencjał rozwojowy i zdolność implantacyjną, czego dowodem była ciąża pięcioparcza po przeniesieniu 5 zarodków określonych jako „poor quality” (25).

Osobnym problemem jest dążenie do uzyskania potomstwa pożądanego płci. U zwierząt do komercyjnego zastosowania weszło sortowanie plemników według przenoszonej płci metodą cytometrii przepływową (nasienie seksowane). U bydła otrzymuje się oczekiwaną płć potomstwa na poziomie 90%. Także u ludzi istnieją możliwości wpływania na płć dziecka przez przedimplantacyjną selekcję zarodków w tym kierunku, co jednak jest ciągłym przedmiotem zainteresowania gremiów opiniotwórczych i decyzyjnych z powodu kontrowersyjności takiego postępowania (26, 27). Dochodzi też czasem do tego, że zarodki traktuje się jak materiał biologiczny. Między innymi zaleca się zamrażanie plemników od dojrziałych płciowo chłopców oraz zamrażanie oocytów od dojrziałych płciowo dziewcząt, a także pochodzących od nich zarodków jako metody na zachowanie możliwości rozmnażania w przyszłości, w szczególności przed wdrożeniem leczenia onkologicznego chirurgicznego lub chemioterapii (28, 29). Takie procedury proponowane są także w Polsce.

Negatywne skutki techniki wspomaganego rozrodu

Piętnowanie genów (jednego z pary alleli pochodzenia matczyńskiego i ojcowskiego) przez ich metylację jest procesem powodującym, że pomimo ich obecności w genomie nie wykazują one swego działania, podczas gdy drugi allel pozostaje aktywny. Jest to zjawisko fizjologiczne, niezbędne dla prawidłowego rozwoju organizmu. Procedury ART prowadzą niekiedy do zakłócenia procesu piętnowania genetycznego, błędnej metylacji pewnych genów i zaburzeń ich ekspresji (30). U przezuwaczy (bydło, owce) znany jest zespół dużego potomstwa (large offspring syndrome – LOS; 31, 32, 33). Charakteryzuje się on ponadnormalną masą urodzeniową, powiększeniem języka, przepukliną pępkową, powiększeniem narządów wewnętrznych (wisceromegalia) oraz hipoglikemią, a także zaburzoną czynnością łożyska. Podobnie jak u zwierząt, także u ludzi mutacje genowe i zaburzenia piętnowania genów (imprintingu) mogą być spowodowane procedurami ART i prowadzić do zespołów chorobowych, jak zespół Beckwitha-Wiedemanna, którego ryzyko wzrasta 3–5-krotnie u dzieci pochodzących z IVF (34, 35). Głównymi objawami tego zespołu są: makrosomia, inaczej gigantyzm (ponadnormalne rozmiary ciała), makroglosja (ponadnormalne rozmiary języka) i wady w obrębie ściany brzucha, np. przepukliny. U osób z tą mutacją istnieje także wzmożone ryzyko guzów zarodkowych. Zespół Beckwitha-Wiedemanna

bardzo przypomina spotykany u przeżuwaczy, a wspomniany wyżej LOS, zarówno pod względem objawów, jak również podobieństw epigenetycznych (36, 37).

Duży odsetek zarodków pochodzących z zapłodnienia pozaustrojowego (ale także z zapłodnienia *in vivo*) cechuje aneuploidia – odchylenie w liczbie chromosomów. W istotnym stopniu zależy to od wieku matki, gdyż ten rodzaj aberracji powstaje przede wszystkim podczas żeńskiej mejozy, czyli powstawania oocytów, aczkolwiek występuje też w plemnikach, szczególnie u mężczyzn o złych parametrach nasienia. W procedurach zapłodnienia pozaustrojowego wykazywana jest aneuploidia na poziomie 50–60% i jest uważana za jedną z ważnych przyczyn poronień w pierwszym trymestrze ciąży (23, 38, 39, 40).

Jednym ze zjawisk związanych z technikami ART i ET są ciążę mnogie, głównie bliźniacze. Przenoszenie większej liczby zarodków bydłowych, zwykle dwóch, zapewnia większy odsetek ciąż ogółem, ale jednocześnie wzrasta udział ciąż bliźniaczych. U tego gatunku ciąża bliźniacza różnopłciowa powoduje w 90% przypadków niedorozwój narządów płciowych u osobników żeńskich wskutek oddziaływania współistniejącego płodu męskiego. Jest to frymartynizm, powodujący nieplodność większości jałówek urodzonych z takiej ciąży. Obecnie można temu zapobiec między innymi przez wprowadzanie zarodków uzyskanych z zapłodnienia nasieniem seksowanym (41, 42), co jednak zwiększa koszty całego postępowania, a odsetek ciąż w dużej skali nie przekracza 40% (43).

W związku ze stosowaniem technik ART u ludzi, w tym hormonalnej stymulacji jajników, samej lub w połączeniu z IVF/ICSI i przeniesieniem więcej niż jednego zarodka wzrasta szansa ciąży mnogiej, zwłaszcza bliźniaczej. Około 40% dzieci pochodzących z zapłodnienia pozaustrojowego pochodzi z ciąży bliźniaczych. Dla matek niesie to zwiększone ryzyko zachorowalności (między innymi nadciśnienia, stanów przedrzucawkowych, cukrzycy ciążowej), trudnego porodu, w tym rozwiązania przez cięcie cesarskie i krwawień poporodowych. Natomiast noworodki pochodzące z ciąży bliźniaczych są bardziej narażone na problemy okołoporodowe wymagające intensywnej opieki medycznej, a także wykazują większą skłonność do wad wrodzonych, zaburzeń funkcji poznawczych, częściej też wymagają hospitalizacji pediatrycznej i zabiegów chirurgicznych (44, 45, 46, 47). Występuje także patologia ciąży bliźniaczej zwana zespołem znikającego płodu. Polega on na obumarciu jednego z płodów, zwykle dość wczesnym, i jego resorpcji. Płody bliźniacze, które przeżyją, są jednak bardziej narażone na komplikacje. W szczególności

opisano ponaddwukrotnie większe ryzyko przedwczesnego porodu (poniżej 32 tygodni), niskiej masy urodzeniowej (poniżej 1500 g), śmiertelność zaś wzrastała trzykrotnie w porównaniu do noworodków z ciąży pojedynczej. Nie wykazano przy tym, aby duże wady rozwojowe występowały u bliźniąt pochodzących z IVF były istotnie częstsze niż u bliźniąt kontrolnych (46, 47). W celu ograniczenia ciąż bliźniaczych wprowadzono np. procedurę niszczenia nadliczbowych zarodków/płodów, tzw. selektywnej redukcji ciąży, aby doprowadzić do pojedynczego porodu, jak też uśmiercanie płodów uznanych za wadliwe za pomocą dosercowych iniekcji chlorku potasu.

Z uwagi na wysokie prawdopodobieństwo ciąży mnogiej i związanych z nią komplikacji (np. niedojrzałość noworodków, trudny poród) u ludzi poleca się ograniczenie liczby wprowadzanych zarodków zależnie od indywidualnych wskazań, między innymi wieku matki (45). Za jedno z istotnych powikłań procedury IVF/ICSI uważa się skłonność do podziału zarodka i rozwoju ciąży mnogiej jednojajowej (monozgotycznej), szczególnie jeżeli hodowla zarodków jest dłuższa – do stadium blastocysty (48). Opisano przypadek, kiedy po przeniesieniu dwóch zarodków 2-dniowych doszło do podziału każdego z nich i powstała ciąża czworacza, którą stanowiły dwie pary bliźniąt jednojajowych, co stwierdzono w badaniu ultrasonograficznym w 36 dniu ciąży. Jedną parę zarodków uśmiercono celowo (tzw. nieselektywna redukcja ciąży), a druga także nie przeżyła (49). W innym przypadku, kiedy zdecydowano się na intensywną opiekę podczas ciąży czworacznej (podwójnej monozygotycznej), doszło do urodzenia czworga zdrowych noworodków – dwóch chłopców i dwóch dziewczynek w drodze planowego cięcia cesarskiego wykonanego w 34 tygodniu ciąży (50). Bardziej wyrafinowanym postępowaniem jest wspomniana wyżej „selektywna redukcja ciąży”. Polega ona na świadomym wyborze, którym z zarodków dać szansę życia, a które zabić, np. przez dosercową punkcję z aspiracją lub wstrzyknięcie chlorku potasu. W niektórych krajach uśmiercania dokonywano w różnym wieku, np. w ciąży 5-tygodniowej i starszej lub nawet po 12 tygodniu (51, 52, 53).

U kobiet z dobrym rokowaniem (wiek poniżej 35 lat i co najmniej 2 zarodki dobrej jakości w 4 dniu po pozyskaniu oocytów) wprowadzenie jednego zarodka nie zmniejsza istotnie szansy na ciążę w porównaniu do dwu przeniesionych zarodków i dlatego jest rekomendowane u takich pacjentek (54, 55, 56). Pozostaje natomiast problem pozostałych zarodków. Powszechne jest ich zamrażanie, które,

jak wiadomo, obniża ich szansę przeżycia po rozmrożeniu z uwagi na uszkodzenia powstałe podczas tych procesów. Mrożenie obniża kompetencję rozwojową zarodków, co wykazano np. u bydła, owiec, kóz, świń, koni. Dotyczy to zwłaszcza zarodków z IVF. Część zamrożonych zarodków po rozmrożeniu i po zdeponowaniu w macicy biorczyń nie podejmuje rozwoju i zaimięcia. Klasyczna metoda wolnego mrożenia jest współcześnie zastąpiona metodą ultrazszybkiego mrożenia – witrifikacji, która zapewnia wyższy odsetek przeżycia po rozmrożeniu. Przeżywalność witrifikowanych zarodków bydłowych w dużej mierze zależy od zastosowanych pożywek hodowlanych, ich objętości, składu i dodatków, np. współhodowli z komórkami jajowodu lub komórkami ziarnistymi. Po przeniesieniu kriokonserwowanych zarodków uzyskano ich przeżywalność na poziomie około 45% (57). Witrifikacja metodą Cryotop zarodków bydłowych w stadium blastocysty cechowała się ich przeżywalnością po rozmrożeniu na poziomie 87% wobec 100% zarodków niepoddanych witrifikacji. Jednocześnie w pewnych komórkach zarodków mrożonych stwierdzono ograniczony wzrost apoptozy jako jedyny skutek stresu witrifikacyjnego (58). Podobnie u ludzi proces mrożenia-rozmrażania powoduje, że część zarodków (lub wszystkie) z indywidualnego IVF może nie przeżyć. Poza tym zarodki zamrożone są narażone na ryzyko śmierci lub uszkodzenia w wyniku problemów technicznych, wad kontenera, obniżenia się poziomu ciekłego azotu w kontenerze oraz innych wypadków, katastrof lub błędów człowieka (59). Na stronie internetowej jednego z ośrodków w Polsce znajduje się informacja, że odsetek przeżywalności zarodków kriokonserwowanych utrzymuje się na poziomie 85–90%, a odsetek ciąż po przeniesieniu rozmrożonych zarodków dochodzi, w zależności od metody, do 25–30%. Według innych informacji aktualnie uzyskuje się ponad 50% ciąż po przeniesieniu witrifikowanych zarodków (60).

Badania retrospektywne u ludzi wykazały, że po zapłodnieniu pozaustrojowym w 1,4% badanych cykli wystąpiły duże wady wrodzone (major congenital anomalies; 61), podczas gdy według innych badań stwierdzono je u ponad 4% dzieci urodzonych po przeniesieniu mrożonych zarodków (62). Są to wady w znacznym stopniu upośledzające czynności organizmu lub prowadzące do jego śmierci. Z kolei badania duńskie nie wykazały różnic w występowaniu dużych wad wrodzonych pomiędzy dziećmi pochodzącymi z naturalnego poczęcia i z IVF, jednak odsetek wad w obu grupach (4,6–4,8%) był, prawdopodobnie z powodu dużego udziału bliźniąt, znacznie wyższy od średniej populacyjnej

wynoszącej 2,8% (63). Przy zapłodnieniu pozaustrojowym z użyciem plemników pochodzących od mężczyzn z oligospermia należy brać pod uwagę możliwość aberracji chromosomowych i wystąpienia na tym tle wad u potomstwa (44). Wskazują też na to badania Bonduelle i wsp. (64) wykazujące wyższy od populacyjny udział anomalii kariotypu u płodów pochodzących z zapłodnienia pozaustrojowego. Wskazuje się też na potencjalne ryzyko chorób nowotworowych u dzieci po zabiegach ART w wyniku mutacji lub uszkodzeń DNA. Ten problem nie jest wyjaśniony, ale nie powinien być ignorowany (44, 65). W szczególności ciąży po ICSI mogą być związane ze zwiększonym ryzykiem aberracji chromosomowych, w tym anomalii chromosomów płciowych (65). Z 8 oocytów po mikroiniekcji plemników uzyskano 7 zarodków, które poddano monitoringowi podczas hodowli w systemie time-lapse. Tylko dwa zarodki przeżyły prawidłowy rozwój i zostały w 3 dniu przeniesione do macicy biorczyni, co zaowocowało ciążą bliźniaczą. Pozostałych 5 zarodków wstrzymało rozwój, nie osiągając stadium blastocysty w dniach 5–6 po zapłodnieniu (66). Rodzi to kolejny problem: postępowania z takimi zarodkami. Odnosne publikacje nie dostarczają na ten temat informacji, co daje podstawy do spekulacji i domysłów (żeby ująć to możliwie delikatnie). Wykazano też, że wśród bliźniąt pochodzących z ICSI istotnie częściej występują przedwczesne porody, ekstremalnie niska masa urodzeniowa (<1000 g) i śmiertelność okołонатalna (67). Z kolei ekstremalnie niska masa urodzeniowa jest związana z zaburzeniami występującymi w późniejszym życiu. Spośród takich dzieci tylko 59% dożyło wieku 5 lat, a spośród nich tylko u ¼ stwierdzono normalny rozwój. U pozostałych występowały różne zaburzenia, w tym neurologiczne, laryngologiczne, oftalmologiczne (68).

Otwartym problemem są możliwe odległe osobnicze i populacyjne skutki procedur ART. Zwraca się uwagę na potrzebę bacznej obserwacji w tym zakresie. Na razie trudno jest je ocenić, gdyż pierwsza osoba po zapłodnieniu pozaustrojowym urodziła się w 1978 roku, czyli przed 38 laty. Badania 5-latków z pięciu krajów europejskich wykazały, że dzieci pochodzące z klasycznego IVF i ICSI bardziej wymagały opieki medycznej niż te z naturalnych ciąż (69). Z kolei u dzieci w wieku 8 lat duże wady wrodzone były obserwowane u jedynaków po ICSI istotnie częściej (15/150) niż po ciążach spontanicznych (5/147). Większość tych wad korygowano za pomocą zabiegów chirurgicznych (70).

Kolejnym elementem ryzyka jest możliwość zakażenia zarodka lub jego biorczyni patogenami wirusowymi lub bakteryjnymi

na poszczególnych etapach procedury: postępowania z gametami, zapłodnienia i hodowli *in vitro*, mikromanipulacji, przechowywania i transportu zarodków, deponowania biorczynom. Wspomniane ryzyko wzrasta w sytuacji stosowania współcześnie zabiegów pomocniczych: biopsja oocytu, ciałka kierunkowego lub zarodka, czy wspomagane wykluwanie blastocysty (assisted hatching) uszkadzających osłonkę przejrzystą, stanowiącą naturalną ochronę oocytu, a następnie zarodka. Należy zaznaczyć, że procedury biotechnologiczne są w tym względzie rygorystyczne i stale doskonalone, a udokumentowane przypadki zakażeń są rzadkie, jednak stosowane zabezpieczenia nie eliminują całkowicie tego zagrożenia (71, 72).

Istnieją opinie, że u ludzi nasila się występowanie ciąż ektopowych. Może to być spowodowane wzmożoną ich wykrywalnością, ale jako jedną z przyczyn sugeruje się także zwiększenie udziału technik wspomaganego rozrodu (73). Wskazuje się mianowicie na zwiększoną podatność na ciążę ektopową u ludzi w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego, szczególnie w związku z niedrożnością jajowodów. Stwierdzono wyższy odsetek ciąż ektopowej po przeniesieniu świeżych zarodków w stadium podziałowym niż w stadium blastocysty i dwóch zarodków w porównaniu do pojedynczego. Z kolei przeniesienie mrożonych blastocyst redukowało to ryzyko w porównaniu do blastocyst świeżych (74). Rzadkie ogółem przypadki ciąży jawnikowej opisano u kobiet po przeniesieniu blastocyst pochodzących z zapłodnienia *in vitro*, w tym przy zastosowaniu techniki mikroiniekcji plemnika do ooplazmy – ICSI. Ten rodzaj ektopii występował po przeniesieniu zarodków świeżych i mrożonych (75, 76, 77, 78, 79).

Zrosnięte płody (zrosłaki, bliźnięta syjamskie) są rzadką wadą występującą u ludzi z nasileniem 1:100 000 do 1:200 000 żywych urodzeń. Ta wada rozwojowa powstaje u bliźniąt monozygotycznych i wśród nich stanowi już 1%. Uważa się, że przenoszenie zarodków podczas procedur IVF nasila ryzyko bliźniąt monozygotycznych, a wśród nich zrosniętych, prawdopodobnie głównie w wyniku manipulacji prowadzących do uszkodzenia osłonki przejrzystej. Wadę spotykano zarówno po przeniesieniu zarodków w stadium podziałowym, jak i w stadium blastocysty. Opisano między innymi płody zrosnięte klatką piersiową (*thoracopagus*), w tym ze wspólnym sercem lub pępkim. Bywają to płody symetryczne dojrzałe, jak też potworkowate – tzw. pasożytnicze. W pewnych przypadkach przeprowadza się także tzw. selektywną selekcję przez przebrzuszną iniekcję dosercową chlorku potasu lub przerwanie ciąży (80, 81, 82, 83, 84, 85, 86).

Podsumowanie

Na koniec, korzystając z prawa przysługującego autorowi, chciałbym przedstawić jako konkluzję własny pogląd na stosowanie procedur zapłodnienia pozaustrojowego. Dopuszczam mianowicie zabiegi wspomaganego rozrodu u zwierząt, gdyż kompleksowo służą one ludziom – ostatecznym beneficjentom, w tym jako procedury przyspieszające postęp hodowlany albo mające na celu zachowanie zagrożonych gatunków czy poznawanie procesów biologicznych. Jednocześnie godzę się z tym, że część zarodków powstałych *in vivo* lub wyhodowanych *in vitro* ulegnie zniszczeniu przypadkowemu lub celowemu. Jestem przy tym świadomy ryzyka zamieralności zarodków, ronięć, patologii ciąży, problemów porodowych i powstania wad rozwojowych. Pomimo tych obciążeń uważam takie postępowanie za uzasadnione i usprawiedliwione, jak wspominałem, dla dobra człowieka. Z tych samych powodów – szeroko pojętego dobra mojego gatunku *Homo sapiens* – jestem przeciwny stosowaniu zapłodnienia pozaustrojowego u ludzi. Nie akceptuję wymienionych w artykule procedur, zwłaszcza w odniesieniu do zarodków ludzkich i traktowania ich jak materiału hodowlanego, którego losy uzależnia się nie tylko od praw natury, ale także od subiektywnych decyzji dawców (gamet), biorczyń, laborantów, lekarzy czy wreszcie opinii różnych stowarzyszeń i regulacji ustawodawców. Nie uważam też za słuszne podejmowanie niepotrzebnego (jeżeli nawet niewielkiego) ryzyka patologii ciąży, trudnego porodu, chorób matki i obciążeń płodu jako zagrożenie nieuzasadnionych, gdyż nie znajdują dla nich biologicznego usprawiedliwienia.

Piśmiennictwo

- Bredbacka P, Huhtinen M, Aalto J, Rainio V: Viability of bovine demi- and quarter-embryos after transfer. *Theriogenology* 1992, **38**, 107–113.
- Rho G.J., Johnson W.H., Betteridge K.J.: Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 1998, **50**, 885–895.
- Kimura K., Matsuyama S.: Evaluation of an alternative embryo transfer strategy to mitigate early embryonic loss and differential gene expression in endometria of fertile and sub-fertile cattle. *International Conference on Biology and Pathology of Reproduction in Domestic Animals* September 28–30, 2015 Gdańsk, 21–23.
- Sawai K.: Molecular mechanisms involved in segregation of inner cell mass and trophoctoderm lineages in bovine and porcine embryos. *International Conference on Biology and Pathology of Reproduction in Domestic Animals* September 28–30, 2015 Gdańsk, 11–15.
- Hasler J.E.: In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Hum. Reprod.* 2000, **15** Suppl 5, 47–58.
- Sakaguchi M., Geshi M., Hamano S., Yonai M., Nagai T.: Embryonic and calving losses in bovine mixed-breed twins induced by transfer of *in vitro*-produced embryos to bred recipients. *Anim. Reprod. Sci.* 2002, **72**, 209–221.
- Numabe T., Oikawa T., Kikuchi T., Horiuchi T.: Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer

- of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, **64**, 13–20.
8. van Wagtenonck-de Leeuw A.M., Aerts B.J., den Daas J.H.: Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 1998, **49**, 883–894.
 9. Bonilla L., Block J., Denicol A.C., Hansen P.J.: Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. *J. Dairy Sci.* 2014, **97**, 229–239.
 10. Buckett W.M., Chian R.C., Holzer H., Dean N., Usher R., Tan S.L.: Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in vitro maturation, in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Obstet. Gynecol.* 2007, **110**, 885–891.
 11. Perkel K.J., Tscherner A., Merrill C., Lamarre J., Madan P.: The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Mol. Reprod. Dev.* 2015 Jul 17. doi: 10.1002/mrd.22525.
 12. Papadopoulos S., Rizos D., Duffy P., Wade M., Quinn K., Boland M.P., Lonergan P.: Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* 2002, **74**, 35–44.
 13. Ochota M., Pasięka A., Niżański W.: Czas brzdękowania zarodków kocih wpływa na rozwój i jakość blastocyst in vitro. *Materiały XI Kongresu Problemy w rozrodczości zwierząt: płodność, ciąża, noworodek*. Wrocław 17–18. 10. 2015, 125–127.
 14. Lindner G.M., Wright R.W. Jr.: Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983, **20**, 407–416.
 15. Bielański A., Tischner M.: *Biotechnologia rozrodu zwierząt udomowionych*. Wydawnictwo i Drukarnia DRUKROL S.C., Kraków 1997, 144–145.
 16. Gardner D.K., Sakkas D.: Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer – a review. *Placenta* 2003, **24** Suppl. B:55–12.
 17. Kovacs P.: Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014, doi: 10.1186/1477-7827-12-124.
 18. Kaser D.J., Racowsky C.: Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 2014, **20**, 617–631.
 19. Kropp J., Khatib H.: Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J. Dairy Sci.* 2015, **98**, 6552–6563.
 20. Kropp J., Khatib H.: mRNA fragments in in vitro culture media are associated with bovine preimplantation embryonic development. *Front. Genet.* 2015, doi: 10.3389/fgene.2015.00273.
 21. Kropp J., Salih S.M., Khatib H.: Expression of microRNAs in bovine and human preimplantation embryo culture media. *Front. Genet.* 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00091.
 22. Haimov-Kochman R., Daum H., Lossos F., Aizenman E., Werner M., Yagel S., Laufer N., Simon A., Hurwitz A.: Monozygotic multiple gestation after intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* 2009, **92**, doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.002.
 23. Capalbo A., Rienzi L., Cimadomo D., Maggilli R., Elliott T., Wright G., Nagy Z.P., Ubaldi E.M.: Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum. Reprod.* 2014, **29**, 1173–1181.
 24. Munné S., Fischer J., Warner A., Chen S., Zouves C., Cohen J., Referring Centers PGD Group: Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil. Steril.* 2006, **85**, 326–332.
 25. Esfandiari N., Claessens E.A., Gotlieb L., Casper R.F.: Don't judge a book by its cover: a quintuplet pregnancy following transfer of five poor-quality embryos. *Fertil. Steril.* 2008 **90**, doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.087.
 26. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine: Use of reproductive technology for sex selection for nonmedical reasons. *Fertil. Steril.* 2015, **103**, 1418–1422.
 27. Wilhelm M., Dahl E., Alexander H., Brähler E., Stöbel-Richter Y.: Ethical attitudes of German specialists in reproductive medicine and legal regulation of preimplantation sex selection in Germany. *PLoS One* 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0056390.
 28. Estes S.J.: Fertility Preservation in Children and Adolescents. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2015, **44**, doi: 10.1016/j.ecl.2015.07.005.
 29. Levine J.: Fertility preservation in children and adolescents with cancer. *Minerva Pediatr.* 2011, **63**, 49–59.
 30. Opiela J., Kańska-Książkiewicz L.: Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. Cz. II. Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej. *Biotechnologia* 2005, **2** (69), 151–162.
 31. Farin P.W., Piedrahitá J.A., Farin C.E.: Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006, **65**, 178–191.
 32. Greve T., Callesen H.: Embryo technology: implications for fertility in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 2005, **24**, 405–412.
 33. Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I.: Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 1998, **3**, 155–163.
 34. Gosden R., Trasler J., Lucifora D., Faddy M.: Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 2003, **361**, 1975–1977.
 35. Vermeiden J.P., Bernardus R.E.: Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil. Steril.* 2013, **99**, 642–651.
 36. Chen Z., Robbins K.M., Wells K.D., Rivera R.M.: Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics* 2013, **8**, 591–601.
 37. Robbins K.M., Chen Z., Wells K.D., Rivera R.M.: Expression of KCNQ1OT1, CDKN1C, H19, and PLAGL1 and the methylation patterns at the KvDMR1 and H19/IGF2 imprinting control regions is conserved between human and bovine. *J. Biomed. Sci.* 2012, doi: 10.1186/1423-0127-19-95.
 38. Kushnir V.A., Frattarelli J.L.: Aneuploidy in abortuses following IVF and ICSI. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2009, **26**, 93–97.
 39. Requena A., Bronet E., Guillén A., Agudo D., Bou C., García-Velasco J.A.: The impact of in-vitro maturation of oocytes on aneuploidy rate. *Reprod. Biomed. Online.* 2009, **18**, 777–783.
 40. Spandorfer S.D., Davis O.K., Barmat L.L., Chung P.H., Rosenwaks Z.: Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 2004, **81**, 1265–1269.
 41. Xu J., Guo Z., Su L., Nedambale T.L., Zhang J., Schenk J., Moreno J.F., Dinnyés A., Ji W., Tian X.C., Yang X., Du F.: Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.* 2006, **89**, 2510–2518.
 42. Xu J., Chaubal S.A., Du F.: Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 2009, **71**, 39–47.
 43. Pontes J.H., Silva K.C., Basso A.C., Rigo A.G., Ferreira C.R., Santos G.M., Sanches B.V., Porcionato J.P., Vieira P.H., Faifer F.S., Sterza E.A., Schenk J.L., Seneda M.M.: Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 2010, **74**, 1349–1355.
 44. Allen V.M., Wilson R.D., Cheung A.: Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC); Reproductive Endocrinology Infertility Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC): Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 2006, **28**, 220–250.
 45. Joint SOGC-CFAS: Guidelines for the number of embryos to transfer following in vitro fertilization No. 182, September 2006. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2008, **102**, 203–216.
 46. Pinborg A.: IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum. Reprod. Update* 2005, **11**, 575–593.
 47. Pinborg A., Lidgaard O., la Cour Freiesleben N., Andersen A.N.: Consequences of vanishing twins in IVF/ICSI pregnancies. *Hum. Reprod.* 2005, **20**, 2821–2829.
 48. Milki A.A., Jun S.H., Hinckley M.D., Behr B., Giudice L.C., Westphal L.M.: Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil. Steril.* 2003, **79**, 503–506.
 49. Carrillo-Vadillo R., Garcia-Lozano J.C., Lozano Arana M.D., Molini Rivera J.L., Sánchez Martín P., Antifólo G.: Two sets of monozygotic twins after intracytoplasmic sperm injection and transfer of two embryos on day 2. *Fertil. Steril.* 2007, **88**, e3–5.
 50. Grgic O., Ivanisevic M., Djelmis J., Lucinger D., Krile L.: Successful pregnancy and delivery of two sets of monozygotic twins after intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer: case report and literature review. *Fertil. Steril.* 2009, **92**, doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.011.
 51. Li Y., Yang D., Zhang Q.: Dichorionic quadramniotic quadruple gestation with monochorionic triamniotic triplets after two embryos transfer and selective reduction to twin pregnancy: case report. *Fertil. Steril.* 2009, **92**, doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.08.022.
 52. Pantos K., Kokkali G., Petroutsou K., Lekka K., Malligiannis P., Koratzis A.: Monochorionic triplet and monoamniotic twins gestation after intracytoplasmic sperm injection and laser-assisted hatching. *Fetal Diagn. Ther.* 2009, **25**, 144–147.
 53. Wehbe S.A., Tucker M.J., Palermo G.D., Sills E.S.: Monozygotic twin delivery following reduction from quadramniotic-dichorionic gestation established after ICSI and embryo transfer: Case report. *Hum. Reprod.* 2003, **18**, 444–446.
 54. Koryntová D., Moosová M., Rezábek K., Pavelková I., Mára M.: Single embryo transfer does not compromise the pregnancy rate in patients with good IVF/ICSI prognosis. *Ceska Gynkol.* 2005, **70**, 435–439.
 55. Milne P., Cottell E., Allen C., Spillane H., Vasallo J., Wingfield M.: Reducing twin pregnancy rates after IVF-elective single embryo transfer (eSET). *Ir. Med. J.* 2010, **103**, 9–11.
 56. Min J.K., Hughes E., Young D., Gysler M., Hemmings R., Cheung A.P., Goodrow G.J., Senikas V., Wong B.C., Sierra S., Carranza-Mamane B., Case A., Dwyer C., Graham J., Havelock J., Lee E., Liu K., Vause T.: Joint Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada-Canadian Fertility and Andrology Society Clinical Practice Guidelines Committee: Elective single embryo transfer following in vitro fertilization. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 2010, **32**, 363–377.
 57. Gajda B., Rajską I.: Aktualny stan i możliwości kriokonserwacji zarodków i oocytów zwierząt gospodarskich. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 2014, **10**, 89–111.
 58. de Oliveira Leme L., Dufort I., Spricigo J.F., Braga T.F., Siraard M.A., Franco M.M., Dode M.A.: Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2015, doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.10.016.
 59. Human Embryo Cryopreservation: <http://www.ivf.com/cryo.html>
 60. ART Newsletter: <http://artnewsletter.pl/artykuly/2/> Kriokonserwacja-zarodkow-niezbedny-element-procedury-zapłodnienia-pozastrojowego.php
 61. Jwa J., Jwa S.C., Kuwahara A., Yoshida A., Saito H.: Risk of major congenital anomalies after assisted hatching: analysis of three-year data from the national assisted reproduction registry in Japan. *Fertil. Steril.* 2015, **104**, 71–78.
 62. Pelkonen S., Hartikainen A.L., Ritvanen A., Koivunen R., Martikainen H., Gissler M., Tiitinen A.: Major congenital anomalies in children born after frozen embryo transfer: a cohort study 1995–2006. *Hum. Reprod.* 2014, **29**, 1552–1557.
 63. Westergaard H.B., Johansen A.M., Erb K., Andersen A.N.: Danish National In-Vitro Fertilization Registry 1994 and 1995: a controlled study of births, malformations and cytogenetic findings. *Hum. Reprod.* 1999, **14**, 1896–1902.
 64. Bonduelle M., Liebaers I., Deketelaere V., Derde M.P., Camus M., Devroey P., Van Steirteghem A.: Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991–1999) and of 2995 infants born after IVF (1983–1999). *Hum. Reprod.* 2002, **17**, 671–694.
 65. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, Okun N., Sierra S.: Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 2014, **36**, 64–83.
 66. Radwan P., Krasieński R., Radwan M., Połać I.: Żywa ciąża bliźniacza otrzymana za pomocą metody ciągłego monitorowania zarodków u pacjentki z niepłodzeniami IVF-ET – opis przypadku i przegląd piśmiennictwa. *Ginekol. Pol.* 2014, **85**, 304–308.
 67. Moini A., Shiva M., Arabipour A., Hosseini R., Chehrizi M., Sadeghi M.: Obstetric and neonatal outcomes of twin pregnancies conceived by assisted reproductive technology compared with twin pregnancies conceived spontaneously: a prospective follow-up study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2012, **165**, 29–32.
 68. Mikkola K., Ritari N., Tommiska V., Salokorpi T., Lehtonen L., Tammela O., Pääkkönen L., Olsen P., Korkman M., Fellman V.: Neurodevelopmental outcome at 5 years of age of a national cohort of extremely low birth weight infants who were born in 1996–1997. *Pediatrics* 2005, **116**, 1391–1400.
 69. Bonduelle M., Wennerholm U.B., Loft A., Tarlatzis B.C., Peters C., Henriot S., Mau C., Victorin-Cederquist A., Van Steirteghem A., Balaska A., Emberson J.R., Sutcliffe A.G.: A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum. Reprod.* 2005, **20**, 413–419.
 70. Belva F., Henriot S., Liebaers I., Van Steirteghem A., Celestin-Westreich S., Bonduelle M.: Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born >or=32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group. *Hum. Reprod.* 2007, **22**, 506–515.

71. Bielanski A.: Biosafety in embryos and semen cryopreservation, storage, management and transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014, **753**, 429–465.
72. Bielanski A., Vajta G.: Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum. Reprod.* 2009, **24**, 2457–2467.
73. Kulp J.L., Barnhart K.T.: Ectopic pregnancy: diagnosis and management. *Womens Health (Lond Engl)* 2008, **4**, 79–87.
74. Li Z., Sullivan E.A., Chapman M., Farquhar C., Wang Y.A.: Risk of ectopic pregnancy lowest with transfer of single frozen blastocyst. *Hum. Reprod.* 2015, **30**, 2048–2054.
75. Atabekoglu C.S., Berker B., Dunder I.: Ovarian ectopic pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004, **112**, 104–106.
76. Dursun P., Gultekin M., Zeyneloglu H.B.: Ovarian ectopic pregnancy after ICSI-ET: a case report and literature review. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2008, **278**, 191–193.
77. Ishikawa H., Sanada M., Shozu M.: Ovarian pregnancy associated with a fresh blastocyst transfer following in vitro fertilization. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2015, doi: 10.1111/jog.12790.
78. Kashima K., Yahata T., Yamaguchi M., Fujita K., Tanaka K.: Ovarian pregnancy resulting from cryopreserved blastocyst transfer. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2013, **39**, 375–377.
79. Oliveira F.G., Abdelmassih V., Costa A.L., Balmaceda J.P., Abdelmassih S., Abdelmassih R.: Rare association of ovarian implantation site for patients with heterotopic and with primary ectopic pregnancies after ICSI and blastocyst transfer. *Hum. Reprod.* 2001, **16**, 2227–2229.
80. Allegra A., Monni G., Zoppi M.A., Curcio P., Marino A., Volpes A.: Conjoined twins in a trichorionic quadruplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and quarter laser-assisted zona thinning. *Fertil Steril.* 2007, **87**, e9–12.
81. Fujimori K., Shiroto T., Kuretake S., Gunji H., Sato A.: An omphalopagus parasitic twin after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2004, **82**, 1430–1432.
82. Goldberg Y., Ben-Shlomo I., Weiner E., Shalev E.: First trimester diagnosis of conjoined twins in a triplet pregnancy after IVF and ICSI: case report. *Hum. Reprod.* 2000, **15**, 1413–1415.
83. Hirata T., Osuga Y., Fujimoto A., Oishi H., Hiroi H., Fujiwara T., Yano T., Taketani Y.: Conjoined twins in a triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst transfer: case report and review of the literature. *Fertil. Steril.* 2009, **91**, doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1730.
84. Mercan R., Oktem O., Salar Z., Nuhoglu A., Balaban B., Urman B.: Conjoined twins after intracytoplasmic sperm injection and transfer of day-3 embryos. *Fertil. Steril.* 2011, **96**, doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.002.
85. Poret H., Blanchard M., Lemseffer M., Royere D., Guerif F.: Continental twins after intracytoplasmic sperm injection and transfer of a single day 2 embryo: case report. *Fertil. Steril.* 2010, **93**, doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.08.054.
86. Skupski D.W., Streltsoff J., Hutson J.M., Rosenwaks Z., Cohen J., Chervenak F.A.: Early diagnosis of conjoined twins in triplet pregnancy after in vitro fertilization and assisted hatching. *J. Ultrasound Med.* 1995, **14**, 611–615.