

Późne rodzicielstwo i rozród wspomagany: analiza ryzyka wystąpienia chorób przewlekłych u potomstwa

STRESZCZENIE

W Europie na opóźnione rodzicielstwo (w wieku >35 lat) decyduje się około 50% mężczyzn i 25% kobiet. W ostatnich dekadach, szczególnie w krajach rozwiniętych bezpośredni wpływ na odsuwanie decyzji o urodzeniu dziecka mają czynniki społeczno-ekonomiczne, skuteczne środki antykoncepcyjne oraz dostępność technologii wspomaganego rozrodu (ang. *Assisted Reproduction Technologies*, ART). Rozród wspomagany umożliwia sukces rozrodczy osobom diagnozowanym jako nieplodne lub o obniżonych możliwościach naturalnego zajścia w ciążę z uwagi na choroby, styl życia lub wiek. Badania epidemiologiczne wskazują, że zarówno zaawansowany wiek rodziców jak i ART są związane z podwyższonym ryzykiem powikłań ciąży, okresu okołoporodowego i poporodowego, takimi jak cukrzyca ciążowa, stan przedzrutowy, poronienia, oderwanie łożyska, poród przedwczesny, urodzenie martwego dziecka, zaburzenia neurorozwojowe i pogorszone wskaźniki ogólnego stanu zdrowia potomstwa [1–4]. Brakuje danych odnośnie stanu zdrowia dorosłego potomstwa poczętego w wyniku ART. W naszej pracy skupimy się na dostępnych informacjach dotyczących zmian metabolicznych zwiększających ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych u potomstwa rodziców w zaawansowanym wieku rozrodczym oraz urodzonego przy pomocy ART**. Na koniec odniesiemy się do źródeł powstawania obserwowanych zaburzeń na poziomie gamety i zarodka, dotyczących modyfikacji epigenetycznych, stresu tlenowego oraz uszkodzeń DNA, rozpatrując możliwe działania naprawcze.

WSTĘP

Obecne odraczanie rodzicielstwa należy traktować jako narastający problem społeczny. W Europie, 45% dzieci urodzonych w ciągu ostatniej dekady zostało poczętych przez ojców w wieku 35–54 lat. Coraz częściej spotyka się również późne macierzyństwo. Od 1980 roku średni wiek matki przy pierwszym porodzie stale wzrasta i obecnie wynosi 30 lat. Wskaźnik urodzeń dzieci przez matki w wieku >35 lat w niektórych krajach europejskich osiągnął już 25% [5,6]. Opóźnianie rodzicielstwa negatywnie wpływa na płodność pary. Gdy obniżają się możliwości naturalnego zajścia w ciążę, wówczas ART daje szansę parom w zaawansowanym wieku reprodukcyjnym, na zostanie rodzicami, niekoniecznie biologicznymi. W wyniku ART do tej pory urodziło się ponad 7 milionów dzieci na całym świecie, a liczba ta stale wzrasta. Powyższe dane sugerują, że odraczanie rodzicielstwa i szerokie stosowanie ART może mieć konsekwencje demograficzne jak i zdrowotne dla populacji. Zaawansowany wiek rodzicielski i ART mogą wpływać na programowanie rozwojowe zarodka. Większość obserwowanych zaburzeń ciąży kobiet w zaawansowanym wieku, a także ciąży będącej wynikiem ART, dotyczy zaburzeń transportu łożyskowego oraz powiązanego z nim upośledzenia wzrostu płodu oraz trudnego porodu [7–9]. Podczas gdy zaburzenia ciąży u kobiety w zaawansowanym wieku rozrodczym mogą dotyczyć zarówno zaburzeń samego zarodka, jak i macicy (np. z uwagi na procesy starzenia), obserwacje na zwierzętach umożliwiają obserwacje rozwoju zarodka, którego implantacja i dalszy rozwój po dokonaniu transferu do młodej biorczyni nie jest zaburzony przez starzejący się organizm matki. To oddzielenie czynników zarodkowych od matczynych jest ogromną zaletą obserwacji doświadczalnych na modelach zwierzęcych, umożliwiającą prawidłowe określenie wpływu ART na rozwój zarodka. Badania wczesnych ciąż powstałych w wyniku ART, przeprowadzone przez nasz zespół na najbardziej wskazanym modelu zwierzęcym do obserwacji przebiegu ciąży u ludzi (m. in. z uwagi na podobną wagę urodzeniową wynoszącą ok. 3,0–3,5 kg) [10], rozłożone na poszczególne fazy rozwoju (od momentu implantacji zarodka do zakończenia rozwoju naczyń krwionośnych w łożysku) jednoznacznie wykazały opóźniony rozwój unaczynienia oraz wady serca rozwijającego się płodu widoczne jeszcze przed zakończeniem organogenezy [11–13]. Redukcja naczyń krwionośnych w tkance łożyska, powodująca upośledzony transport składników odżywczych i tlenu do płodu, może skutkować bezpośrednim wstrzymaniem rozwoju ciąży (jak wykazały nasze badania) lub programować podatność płodu na późniejsze choroby, w tym na choroby metaboliczne oraz naczyniowo-sercowe. Nie-

dr Maria Florencia Heber,

mgr Hafsa Gulzar,

mgr Richard Musson,

mgr Simona Bisogno,

inż. Kinga Fic,

prof. dr hab. Grażyna Ewa Ptak✉

Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

https://doi.org/10.18388/pb.2021_457

✉ autor korespondujący: g.ptak@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: wiek rozrodczy, technologie rozrodu wspomaganego (ang. *Assisted Reproduction Technologies*, ART), ciąża zagrożona, zespół metaboliczny, choroby sercowo-naczyniowe, programowanie epigenetyczne, stres tlenowy, uszkodzenia DNA

Finansowanie: Praca powstała przy wsparciu Narodowego Centrum Nauki (2019/35/B/NZ4/03547 oraz 2021/41/B/NZ3/03507), Ministerstwa Edukacji i Nauki (0175/DIA/2019/28), Unii Europejskiej - Program Horyzont 2020 (nr 692185; akronim ERAofART) oraz Uniwersytetu Jagiellońskiego (POB BioS B.1.11.2020.34). MFH jest stypendystką Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) (ULM/2019/1/00097/U/00001).

****Addendum:** Podczas recenzowania pracy zostaliśmy poproszeni o dołączenie opisu pozostałych efektów ART, związanych podwyższonym ryzykiem występowania wad wrodzonych, zaburzeń imprintingu genowego, nowotworów dziecięcych, zaburzeń funkcji poznawczych i innych związanych z nieprawidłowościami neurorozwoju dzieci urodzonych przy zastosowaniu ART. Ponieważ tematyka naszego opracowania nie dotyczy jednak tych zaburzeń, a opis całości nie jest możliwy do ujęcia w pojedynczym artykule, nasze opracowanie odnosi się wyłącznie do rozwoju chorób o podłożu metabolicznym i naczyniowym.

korzystne konsekwencje zaburzeń transportu łożyskowego w środowisku wewnątrzmacicznym mogą przenosić się z pierwszego pokolenia potomstwa na drugie, jak wykazano u potomstwa głodujących podczas wojny kobiet w ciąży [14,15]. Przy czym, drugie pokolenie może mieć jeszcze poważniejsze zaburzenia niż pierwsze, jak wykazano na gryzoniach [16]. Ze względu na stosunkowo niedawne stosowanie ART u ludzi, informacje na temat zdrowia dorosłego potomstwa urodzonego przy pomocy tych procedur, a tym bardziej następnych pokoleń, nie są jeszcze dostępne [17]. Tymczasem, ART będąc efektywną odpowiedzią na zmniejszoną płodność, częściowo spowodowaną przez opóźnienie rodzielstwa, rozwija się szybko.

ZABURZENIA METABOLICZNE

ZWIĄZEK MIĘDZY ZAAWANSOWANYM WIEKIEM MATKI A CHOROBYMI METABOLICZNYMI POTOMSTWA

Ciąża w zaawansowanym wieku rozrodczym (>35 lat) wiąże się między innymi ze zwiększonym ryzykiem stanu przedrzucawkowego, oderwania łożyska, poronień, porodu przedwczesnego, i małej masy urodzeniowej dziecka [3, 18–20]. Większość z tych zaburzeń ciąży stanowi znaczne zagrożenie dla zdrowia zarówno matki, jak i płodu. Wiadomo, że zaawansowany wiek matki wiąże się z zaburzonym rozwojem łożyska, zmniejszając jego wydajność, a tym samym prowadząc do ograniczenia wzrostu płodu, co może predysponować urodzone dziecko do chorób w późniejszym wieku [18,21,22]. Wiadomo również, że ograniczenie wzrostu płodu i mała masa urodzeniowa są związane ze szkodliwymi, długoterminowymi konsekwencjami metabolicznymi takimi jak otyłość, insulinooporność i choroby sercowo-naczyniowe u dorosłych [23,24]. Dlatego, ciąża w zaawansowanym wieku jest związana z ryzykiem chorób metabolicznych (zespół metaboliczny) u potomstwa w dorosłym życiu. Badania epidemiologiczne wykazały, że u dzieci urodzonych przez matki w zaawansowanym wieku rozrodczym istnieje większe ryzyko rozwoju cukrzycy typu 1 i typu 2 [25,26] oraz podwyższone stężenie glukozy w osoczu na czczo [27]. Co więcej, zaawansowany wiek kobiety w ciąży może również wpływać na funkcjonalność sercowo-naczyniową dziecka. Badania wykazały też pozytywną korelację między zaawansowanym wiekiem matki a podwyższonym ciśnieniem krwi u noworodków i małych dzieci [28–30].

Na długoterminowe konsekwencje zdrowotne dla dziecka urodzonego przez matkę w zaawansowanym wieku rozrodczym składają się dwa czynniki: matczyne (1) oraz zarodkowy (2):

(1) Stan zdrowia matki w zaawansowanym wieku rozrodczym jest zwykle pogorszony w stosunku do młodszych kobiet. W pewnym stopniu łączy się to ze stylem życia, odżywianiem, stosowaniem używek. Kobiety z otyłością cierpią na zaburzony transfer składników odżywczych podczas ciąży [31]. Otyłość i cukrzyca matki mają wspólne fenotypy, takie jak dyslipidemia tj. nieprawidłowe stężenia lipidów i lipoprotein w osoczu, dysfunkcja śródbłonna oraz stres oksydacyjny. Wszystko to ma negatywny wpływ na wzrost płodu, zaś urodzone dziecko może cierpieć na zaburzenia

metaboliczne, a w dorosłym wieku na choroby sercowo-naczyniowe. Również niedożywienie matki jak i złe nawyki żywieniowe, a także ekspozycja na substancje zaburzające gospodarkę hormonalną w czasie ciąży są przyczyną małej masy urodzeniowej dziecka [32]. Mogą też wywoływać zmiany metaboliczne w środowisku wewnątrzmacicznym, prowadząc do zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 1 i 2, zespołu metabolicznego oraz chorób sercowo-naczyniowych u potomstwa [22,33]. Powszechnie wiadomo, że niekorzystne warunki w środowisku macicznym, takie jak cukrzyca ciążowa, stan przedrzucawkowy, stan zapalny, wpływają negatywnie na metabolizm rozwijającego się dziecka [1–3].

(2) Zaawansowany wiek jest związany z fizjologicznym obniżaniem się jakości gamet i zarodków w wyniku zwiększonego stresu oksydacyjnego i starzenia się komórek [34,35]. Tak więc zaburzony przebieg ciąży w zaawansowanym wieku dotyczy nie tylko funkcjonowania organizmu matki, ale również zarodka powstałego z gamet rodziców będących w zaawansowanym wieku rozrodczym. W tym kontekście Velazquez i wsp. badając zaburzenia metabolizmu potomstwa myszy urodzonego przez matki w zaawansowanym wieku, wykazali, że fenotyp wskazujący na owe zaburzenia metaboliczne był zaprogramowany jeszcze przed implantacją zarodka, w stadium blastocysty [36]. Szczegółowy opis czynników zarodkowych wpływających na późniejszy stan zdrowia potomstwa zamieszczony jest w trzecim, czwartym i piątym rozdziale tego opracowania.

ZWIĄZEK MIĘDZY ZAAWANSOWANYM WIEKIEM OJCA A CHOROBYMI METABOLICZNYMI POTOMSTWA

Większość opisanych w literaturze stanów patologicznych ciąży, a także okresu okołoporodowego i poporodowego oraz stanu zdrowia potomstwa przypisuje się zaawansowanemu wiekowi matki w momencie poczęcia. Jednak istnieje coraz więcej dowodów na to, że zaawansowany wiek ojca może mieć również negatywny wpływ na rozwój dziecka, wiadomo że zaawansowany wiek ojca wpływa na funkcję jąder a także szereg parametrów plemników takich jak ich żywotność, integralność DNA, długość telomerów i programowanie epigenetyczne [37,38]. Zmiany te, które aktywizują się wraz z normalnym procesem starzenia, mogą mieć negatywny wpływ na płodność i przebieg ciąży. Zwiększa to ryzyko powstawania zaburzeń rozwoju zarodka i płodu [38,39]. Mimo że badania rozwoju płodu i zdrowia potomstwa w tym zakresie są ograniczone, głównie z powodu trudności w odizolowaniu wpływu wieku ojca od wpływu wieku matki, wiadomo że zaawansowany wiek ojca wiąże się ze wzrostem ryzyka poronień [40], urodzeniem martwego dziecka, stanem przedrzucawkowym [41], chorobami wrodzonymi, autyzmem i innymi zaburzeniami psychicznymi [2,42]. Niektórzy autorzy dostrzegają również silną korelację między opóźnionym ojcostwem a opóźnionym rozwojem płodu i małą masą urodzeniową dziecka [39,43,44]. Oba czynniki zwiększają ryzyko chorób metabolicznych dziecka. Jednak dane wykazujące związek zaawansowanego wieku ojca w chwili poczęcia dziecka ze zwiększonym ryzykiem powstawania chorób metabolicznych potomstwa w dzieciństwie lub okresie dojrzewania są ograniczone i częściowo sprzeczne. Jedno z badań wykazało, że zaawansowany wiek ojca wiąże się z wyższym wskaź-

niem otyłości u potomstwa w wieku dorosłym [45]. Inni autorzy nie stwierdzili zmian w masie ciała u nastolatków i małych dzieci poczętych przez starszych ojców, ale donieśli, że zaawansowany wiek ojca jest związany z zaburzonym profilem lipidowym krwi dziecka [46,47]. Dotychczasowe badania na modelu mysim nie wyjaśniły jednoznacznie wpływu na zdrowie metaboliczne potomstwa poczętego przez starszych ojców. Zhao i in., wykazali, że mała masa urodzeniowa, związana z zaawansowanym wiekiem ojca, powoduje zaburzenia metabolizmu glukozy przez co najmniej dwa pokolenia [48], podczas gdy inni autorzy nie wykazali zmian w metabolizmie glukozy i masie ciała u potomstwa myszy spłodzonego przez ojców w zaawansowanym, a także w bardzo zaawansowanym wieku [49].

ZWIĄZEK MIĘDZY TECHNOLOGIAMI WSPOMAGANEGO ROZRODU (ART) A CHOROBYMI METABOLICZNYMI

Część badań donosi o wysokim poziomie glukozy we krwi na czczo u dzieci urodzonych w wyniku ART [50,51]. Jednak badania innych autorów nie wykazały żadnych zmian w metabolizmie glukozy u dzieci [52–54]. Z kolei inni autorzy wykazali nadmiar obwodowej tkanki tłuszczowej u dzieci urodzonych w wyniku ART [51,55,56]. W obecnym momencie nie ma wystarczających informacji odnośnie stanu zdrowia osób dorosłych, poczętych w wyniku ART. Pojawienie się objawów większości chorób przewlekłych łączy się z osiągnięciem wieku co najmniej dorosłego, a ich nasilenie pojawia się w wieku średnim bądź zaawansowanym. Tymczasem większość dzieci poczętych w wyniku ART nie osiągnęła jeszcze dojrzałości.

Dotychczasowe wyniki badań epidemiologicznych dotyczących wpływu ART na ryzyko rozwoju chorób nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy donoszą że, zwiększone ryzyko powstawania chorób przewlekłych u dzieci poczętych w wyniku ART należy przypisać nie samym niekorzystnym oddziaływaniom procedur *in vitro* lecz chorobom wywołującym obniżenie płodności rodziców oraz wiekowi rodziców [57]. Z tego stanowiska część środowiska medycznego wysunęła zbyt daleko idące wnioski prowadzące z jednej strony do negacji wpływu samego ART na ciążę, a z drugiej, kwestionujące celowość dalszych badań doświadczalnych nad wpływem ART. Taka interpretacja prowadzi do ograniczania doświadczeń na zwierzętach, będących jedynym etycznie akceptowalnym źródłem doświadczalnej weryfikacji wpływu ART na ciążę i zdrowie potomstwa. Poniżej skupimy się więc na opisie celowości oraz dotychczasowego stanu badań na zwierzętach odnośnie prezentowanej tematyki.

Zastosowanie modeli zwierzęcych umożliwia weryfikację bezpieczeństwa procedur ART w bezpośredniej korelacji z obserwowanymi parametrami zdrowia potomstwa. To oznacza że inne czynniki zakłócające (np. wiek rodziców, pochodzenie etniczne, stan zdrowia) które odgrywają rolę w przypadku pacjentów ludzkich, nie mają wpływu na wyniki obserwacji i nie zaburzają wyników analiz wykonanych przy użyciu zwierząt. Większość badań wykazała, że myszy poczęte w wyniku ART wykazują nieprawidłowości metaboliczne. ART może zmieniać metabolizm glukozy, powodując hiperglikemię, upośledzoną tolerancję glukozy,

hiperinsulinemię, a w niektórych przypadkach insulinoporność urodzonych myszy [52,58–60]. Feuer i in. donieśli, że potomstwo płci żeńskiej myszy uzyskane przez zapłodnienie *in vitro* miało zwiększoną masę ciała i predyspozycję do odkładania się tłuszczu, a także zmienioną ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm lipidów i podwyższony poziom reaktywnych form tlenu i prozapalnych metabolitów w tkance tłuszczowej [61]. Zwiększona masa ciała i zwiększone odkładanie się tłuszczu u dorastających młodych zostało zaobserwowane również przez innych autorów badających potomstwo myszy uzyskane po zapłodnieniu i hodowli zarodków *in vitro* [59,62]. Rianudo i in. wykazali, że potomstwo myszy uzyskane w wyniku ART miało zmieniony profil metaboliczny wątroby i surowicy krwi, z głównymi zaburzeniami na szlakach metabolizmu glukozy [63]. Zheng i in. donieśli o zmniejszonej aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm glukozy i zaburzeniach na szlaku sygnalizacji insulinowej w wątrobie potomstwa myszy uzyskanych w wyniku ART [60], co może wyjaśnić zmienioną homeostazę glukozy. Inne badanie wykazało że ART negatywnie wpływa na rozwój wątroby myszy, powodując zmieniony metabolizm lipidów i rozwój stłuszczenia wątroby [64]. Ogólnie, wyniki badań na zwierzętach wskazują, że ART może wpływać na metabolizm lipidów i glukozy powodując wysokie ryzyko cukrzycy i zespołu metabolicznego.

CHOROBY SERCOWO-NACZYNIOWE

Choroby sercowo-naczyniowe to grupa zaburzeń związanych z sercem i układem naczyń krwionośnych. Należą do nich udar niedokrwieny, niewydolność serca, choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie i inne. Zaburzenia sercowo-naczyniowe rozpoczynają się od stanu zwanego miażdżycą czyli zwężeniem i pogrubieniem tętnic wieńcowych z powodu gromadzenia się płytki miażdżycowej (złogów cholesterolu) wewnątrz ścian tętnic. Choroby te są główną przyczyną zgonów na całym świecie [65]. W tej sekcji nacisk położono na czynniki ryzyka odgrywające rolę w rozwoju zaburzeń sercowo-naczyniowych u potomstwa, w związku z zaawansowanym wiekiem rodziców oraz ART.

ZWIĄZEK MIĘDZY ZAAWANSOWANYM WIEKIEM MATKI A CHOROBYMI SERCOWO-NACZYNIOWYMI POTOMSTWA

Kobiety w zaawansowanym wieku rozrodczym cierpią na powikłania ciąży najczęściej z powodu wad rozwojowych łożyska, będących z kolei przyczyną suboptymalnego rozwoju płodu, a ostatecznie stanowiących czynnik ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych u urodzonych dzieci [1]. Kolejnym powikłaniem ciąży w zaawansowanym wieku rozrodczym jest stan przedrzucawkowy wiążący się z ryzykiem podwyższonego ciśnienia krwi oraz otyłością u dzieci [66]. Jak wspomniano na początku, ciążę kobiet w zaawansowanym wieku rozrodczym często prowadzą do przedwczesnego porodu i małej masy ciała dziecka [1,3,5–9]. Z kolei przedwczesny poród i mała masa urodzeniowa są związane z podwyższonym ciśnieniem krwi i nadwagą w późniejszym wieku [67]. Te ostatnie zaś są ważnymi czynnikami rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [30,68].

Badania na modelach zwierzęcych wskazują, że wiek matki ma wpływ na programowanie sercowo-naczyniowe w sposób zależny od płci: męskie potomstwo wykazywało dysfunkcję śródbłonna naczyń i upośledzenie czynności serca, podczas gdy potomstwo żeńskie miało podwyższone skurczowe ciśnienie krwi oraz wskaźniki sugerujące zwiększone ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [33,66,69]. Badania na szczurach wykazały w sposób jednoznaczny zależność od płci zmiany w czynności serca potomstwa urodzonego przez matki w zaawansowanym wieku: u samców były to oznaki łagodnej dysfunkcji rozkurczowej lewej komory, objawiającej się skróconym czasem relaksacji, zaś u samic podwyższone ciśnienie skurczowe krwi oraz wydłużony powrót do zdrowia po urazie niedokrwiennoreperfuzyjnym [69].

ZWIĄZEK MIĘDZY ZAAWANSOWANYM WIEKIEM OJCA A CHOROBIAMI SERCOWO-NACZYNIOWYMI POTOMSTWA

Od dość dawna wiadomo, że występowanie wrodzonych wad serca jest częściej obserwowane u dzieci starszych ojców [70–73]. Częstość mutacji *de novo* w linii komórek rozrodczych wzrasta wraz z wiekiem ojca, co może prowadzić do wrodzonych wad serca potomstwa [2,37,74]. Czynnikiem wywołującym powyższe wady może być zwiększająca się wraz z wiekiem męczyzny fragmentacja DNA plemników z powodu stresu tlenowego [75]. Trudno jest jednak jednoznacznie wykazać wpływ fragmentacji DNA i zaawansowanego wieku ojca na zaburzenia genetyczne dzieci. Zaawansowany wiek ojca wiąże się też ze zwiększonym ryzykiem poronień, przedwczesnym porodem i małą masą urodzeniową dziecka [43,44]. Z kolei, niska masa urodzeniowa zwiększa ryzyko chorób sercowo-naczyniowych [67].

ZWIĄZEK MIĘDZY TECHNOLOGIAMI WSPOMAGANEGO ROZRODU (ART) A CHOROBIAMI SERCOWO-NACZYNIOWYMI

Badania epidemiologiczne sugerują, że ART może wywoływać przedwczesną miażdżycę, insulinooporność, nadciśnienie tętnicze, i dysfunkcję serca u pozornie zdrowego potomstwa [76]. Badania mające na celu długoterminową weryfikację parametrów zdrowotnych dzieci i młodzieży poczętych w wyniku ART wykazały podwyższone ryzyko wysokiego ogólnoustrojowego ciśnienia krwi [51–53,55]. Stwierdzono też, że dzieci poczęte w wyniku ART posiadają zmienioną strukturę serca oraz naczyń krwionośnych już podczas rozwoju płodowego (co potwierdzają badania na zwierzętach [11–13]), a po urodzeniu zaburzone profile kardiometaboliczne tj. skurczowe i rozkurczowe ciśnienie krwi oraz poziom glukozy na czczo [51,52,77]. Wspomniane podwyższone ryzyko występowania wysokiego poziomu glukozy na czczo u dzieci poczętych w wyniku zapłodnienia *in vitro* stanowi czynnik rozwoju wielu chorób, między innymi sercowo-naczyniowych [51,52]. Ponadto, u części dzieci urodzonych w wyniku ART zaobserwowano sztywność naczyń krwionośnych oraz dysfunkcję śródbłonna [78]. Zmiany ogólnoustrojowego ciśnienia krwi, funkcji śródbłonna i układu renina-angiotensyna, które mogą odgrywać rolę w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych, wykryto rów-

nież u potomstwa myszy uzyskanego przy pomocy ART [79–82].

Zgodnie z hipotezą rozwojowych przyczyn powstawania chorób (ang. *Developmental Origin of Health and Disease*, DOHaD), reakcje adaptacyjne na bodźce środowiskowe w krytycznych lub wrażliwych okresach wczesnego rozwoju mogą mieć długotrwałe konsekwencje zdrowotne, z powodu stałego przeprogramowania kluczowych systemów fizjologicznych. Zaburzenia wynikające z ekspozycji rozwijających się gamet i zarodków na niekorzystne warunki wywołane przez środowisko *in vitro* w okresie prenatalnym, wiążą się ze zwiększonym ryzykiem dysfunkcji o podłożu sercowo-naczyniowym w życiu poporodowym [83]. Biorąc pod uwagę młody wiek populacji urodzonej w wyniku ART, minie co najmniej 20–30 lat, zanim będą dostępne dane dotyczące pojawiania się chorób sercowo-naczyniowych. Jednak już teraz jest jasne, że ART jawi się jako potencjalnie ważny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych [83]. To spostrzeżenie wymaga od nas zrewidowania poglądów na temat domniemanego bezpieczeństwa ART i zaangażowania się w debatę na temat możliwości redukcji ryzyka procedur ART, a w oczekiwaniu na ten cel, oszczędnego stosowania procedur *in vitro*. Istnieje więc pilna potrzeba lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw wywołanej przez ART zmiany fenotypu sercowo-naczyniowego oraz metabolicznego. Opisane w następnych rozdziałach **modyfikacje epigenetyczne, stres oksydacyjny i uszkodzenia DNA** w zarodkach mogą odgrywać istotną rolę w ich powstawaniu.

RYZYKO MODYFIKACJI EPIGENETYCZNYCH U DZIECI POCZĘTYCH W WYNIKU ART ORAZ PRZEZ RODZICÓW W ZAAWANSOWANYM WIEKU

Podwyższony wiek rodzicielski oraz ART mogą powodować zmiany epigenetyczne (tj. modyfikacje struktury chromatyny, wpływające na ekspresję genów, bez modyfikacji samej sekwencji DNA) w gametach, we wczesnym zarodku oraz w tkance łożyska [84–87]. Programowanie epigenetyczne odbywa się podczas gametogenezy, a następnie podczas rozwoju embrionalnego. W tych momentach epigenom jest podatny na powstawanie zmian stymulowanych środowiskowo, które mogą być natychmiast odzwierciedlone już w fenotypie zarodka lub pojawić się dopiero w późniejszym dorosłym życiu, a nawet w drugim pokoleniu [88,89]. Starzenie się organizmu wiąże się ze zmianami epigenetycznymi zarówno w komórkach somatycznych, jak i rozrodczych [90]. Zaburzenia metylacji DNA zostały wykryte w ludzkiej tkance łożyska w ciążach będących wynikiem ART jak i w plemnikach męczyzn w zaawansowanym wieku rozrodczym [84–87]. Wykazano także, że zarówno zmiany metylacji DNA w plemnikach jak i stymulacja jajników za pomocą hormonów prowadzi do modyfikacji epigenetycznych w zarodku, a także w łożysku [91,92]. Technologie wspomaganego rozrodu ingerują w oocyty i zarodek właśnie podczas programowania epigenetycznego. Procedury pobierania komórek jajowych, ich zapłodnienia, hodowli zarodków, mrożenia, biopsji (w celu przeprowadzenia diagnostyki genetycznej przed implantacją), a także transferu do macicy, odbywają się w czasie programowania epigenetycznego zarodka [93]. Zmiany epigenetyczne w zarodku mogą zaburzyć prawidłowy rozwój ciąży. Mogą także powodować

predyspozycje do rozwoju chorób w dorosłym życiu [94,95]. Do najczęściej obserwowanych zaburzeń ciąży w wyniku ART należą nieprawidłowości i wady łożyska [94,96,97] oraz ograniczenie wzrostu płodu i mała masa urodzeniowa [62,86,98]. Wszystkie te powikłania ciąży, a przede wszystkim dysfunkcje łożyska mogą powodować zaburzenia metaboliczne u dziecka w życiu poporodowym oraz zwiększać ryzyko chorób sercowo-naczyniowych w wieku dorosłym [93,99–101]. Dostępne dane sugerują, że ART wraz z czynnikami rodzicielskimi, takimi jak starzenie się, zwiększa ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych poprzez zmiany epigenetyczne [78].

Jak wykazano na modelach zwierzęcych, metylacja genów związanych z regulacją układu sercowo-naczyniowego jest zaburzona u potomstwa urodzonego w wyniku ART [83]. Zaburzona metylacja promotora genu *eNOS* (ang. *endothelial NO synthase*) w tętnicach myszy urodzonych w wyniku ART, wiąże się z obniżoną ekspresją *eNOS*. Co więcej, powyżej opisane zaburzenia zostały wykazane w jednakowym stopniu u myszy urodzonych w wyniku ART w pierwszym pokoleniu, jak i w drugim, urodzonych w wyniku naturalnego krycia. Zaburzenia metylacji genu *eNOS* w tętnicach były powiązane z dysfunkcją śródbłonna i miażdżycą u myszy urodzonych w wyniku ART [80,81].

Pomimo iż badania wpływu ART na rozwój ciąży i potomstwa prowadzone są przy użyciu szczepów isogenicznych tj. myszy o jednakowym podłożu genetycznym, wykazano znaczące różnice osobnicze w występowaniu zaburzeń metylacji DNA w łożysku w końcowym etapie ciąży, w obrębie badanej grupy [97]. Badania naszego zespołu, dotyczące wczesnego etapu ciąży będącej wynikiem ART prowadzone w homogennych grupach owiec wykazały podobne różnice osobnicze w ekspresji enzymu DNA metyltransferazy 1 oraz jego regulatorów w rozwijających się łożyskach: od ciąż nie wykazujących żadnych zaburzeń po ciąży z zaburzeniami o dużej intensywności (najprawdopodobniej będącymi przyczyną śmierci zarodka obserwowanej w kolejnych dniach) [11]. Podobnie u ludzi, tylko część ciąż (ang. „outlier group”) charakteryzuje się hypometylacją DNA łożysk lub pępowin dzieci urodzonych w wyniku ART w porównaniu z resztą dzieci badanej grupy, tj. również urodzonych w wyniku ART, niewykazujących tego typu zmian [102,103]. W celu wyjaśnienia powyższej obserwacji niektórzy naukowcy sugerowali, że wrażliwość osobnicza na czynniki środowiskowe wpływające na zmiany epigenetyczne we wczesnym okresie rozwoju może powodować te różnice [102]. Nie wiadomo jednak od czego zależy owa wrażliwość, biorąc pod uwagę że różnice osobnicze w epigenomie zarodków powstałych w wyniku ART obserwuje się nie tylko w obrębie badanej grupy złożonej z genetycznie identycznych myszy (szczepów wsobnych), ale nawet w obrębie tej samej ciężarnej samicy ([97], nieopublikowane obserwacje autorów).

RYZIKO STRESU TLENOWEGO W GAMETACH I ZARODKACH PODDANYCH PROCEDUROM ART ORAZ W ZAAWANSOWANYM WIEKU RODZICÓW

Dostarczanie energii potrzebnej do prowadzenia aktywności komórkowej jest najważniejszą funkcją mitochondriów. Mitochondria odgrywają również ważną rolę

w produkcji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) wymaganych do normalnych procesów fizjologicznych. ROS to reaktywne cząsteczki (posiadające niesparowane elektrony), do których neutralizacji niezbędne są przeciwutleniacze np. niektóre witaminy. Gdy ilość wyprodukowanych ROS jest zbyt wysoka, następuje stres tlenowy, a co za tym idzie, upośledzenie łańcucha transportu elektronów, mutacje mtDNA oraz zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej [104]. Upośledzenie funkcji mitochondriów prowadzi więc do nadprodukcji ROS [105].

Zaawansowany wiek ojca wiąże się z wysokimi stężeniami ROS w nasieniu powodując stres tlenowy [106–108]. Stres tlenowy prowadzi do zwiększenia uszkodzeń DNA [109], peroksydacji lipidów i utraty ruchliwości plemnika [110]. W plemnikach mężczyzn w zaawansowanym wieku rozrodczym częściej obserwuje się nieprawidłowy potencjał błony mitochondrialnej [111]. Zarodki uzyskane z plemników charakteryzujących się wysokim poziomem ROS charakteryzują się obniżoną jakością, w tym zmniejszoną liczbą komórek w stadium blastocysty [112–114].

Podczas procedur ART oocyty mogą być narażone na oddziaływanie szkodliwych poziomów ROS w pożywce, obniżając wskaźnik zapłodnienia i powodując fragmentację zarodków [115,116]. Wiele czynników, takich jak wirowanie, pipetowanie, mrożenie a nawet skład pożywek hodowlanych (na przykład obecność jonów metali) może zwiększyć zawartość ROS [117]. Dodatkowo, wahania temperatury i pH, stężenie tlenu w inkubatorze i nieodpowiednia jakość powietrza, może powodować nadmierne wytwarzanie ROS [118]. Podobnie jak w plemnikach, dysfunkcyjne mitochondria w starzejących się oocytach przyczyniają się do zwiększonej produkcji ROS i uszkodzeń DNA [119]. Co więcej, można zaobserwować pętlę sprzężenia zwrotnego, w której środowisko bogate w ROS powoduje z kolei uszkodzenie mitochondriów [120]. Obecność dysfunkcyjnych mitochondriów w oocytach skutkuje nie tylko stresem tlenowym, ale także w zmniejszoną produkcją ATP, co z kolei ma negatywny wpływ na procesy podziału komórki wpływając na punkt kontrolny wrzeczona podziałowego i separację chromatyd [121,122]. Upośledzenie tych mechanizmów wraz ze skróceniem telomerów i zmniejszoną skutecznością mechanizmów naprawy pęknięć dwuniciowych DNA są głównymi przyczynami nieprawidłowości chromosomowych, a następnie zmniejszonego potencjału rozwojowego w oocytach starszych kobiet [123,124]. Zmniejszenie produkcji wewnątrzkomórkowego ATP z powodu dysfunkcji mitochondriów może determinować upośledzenie procesu zapłodnienia i wolniejszy rozwój zarodka ludzkiego. Ogólnie, dysfunkcja mitochondriów spowodowana stresem tlenowym prowadzi do zaburzeń procesu mitozy w zarodkach i skutkuje upośledzeniem ich kompetencji rozwojowych [125–129].

ROS reaguje z tlenkiem azotu (NO) regulującym napięcie naczyń krwionośnych i co za tym idzie ciśnienie tętnicze krwi. Stres tlenowy obniża dostępność NO wyzwalając tym samym kaskadę zdarzeń prowadzących do dysfunkcji śródbłonna i miażdżycy [130]. Miażdżycza, jak wspomniano, jest główną przyczyną rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [131,132]. Badania wykazały, że podawanie przeciwutle-

naczy myszom urodzonym w wyniku ART wykazującym dysfunkcję śródbłonka, poprawia dostępność NO i obniża nadciśnienie tętnicze [78,133]. Co ciekawe, ten sam zespół badawczy przeprowadził potem terapię z zastosowaniem przeciwutleniaczy (czterotygodniową suplementację antyoksydantami, witaminami C i E) u dzieci urodzonych w wyniku ART. Również u dzieci wykazano, że dysfunkcja naczyń związana jest ze stresem tlenowym oraz obniżonym poziomem NO w osoczu: obydwa parametry powróciły do normy po podawaniu przeciwutleniaczy [133]. Nastąpiła też poprawa funkcjonalności śródbłonka naczyń w krążeniu ogólnoustrojowym oraz płucnym, co wskazuje, że dysfunkcja naczyń wywołana przez ART jest odwracalna i zależna od występowania stresu oksydacyjnego.

USZKODZENIA DNA W GAMETACH, ZARODKACH I U POTOMSTWA POCZĘTEGO W WYNIKU ART ORAZ PRZEZ RODZICÓW W ZAAWANSOWANYM WIEKU

Uszkodzenie DNA negatywnie wpływa na zdolność komórki do wykonywania jej podstawowych funkcji i może ostatecznie prowadzić do jej śmierci. Z tego powodu komórki rozrodcze i zarodki są wyposażone w enzymy naprawy uszkodzeń DNA (ang. *DNA damage repair*, DDR), jednak efektywność napraw różni się w zależności od stadium rozwojowego zarodka [134]. Komórka z wysokim poziomem uszkodzeń DNA może ulec zaprogramowanej śmierci (apoptoza). Jest to bezpieczny mechanizm zapobiegający powstawaniu nowotworów. Zarodki są również zdolne do apoptozy, głównie w późniejszych stadiach embriogenezy [135]. Wysoki poziom uszkodzeń DNA może jednak prowadzić do opóźnień cyklu komórkowego i nieprawidłowo naprawionych pęknięć DNA, co ma negatywny wpływ na rozwój ciąży [136]. Zarówno ART, jak i zaawansowany wiek rodzicielski zwiększają szanse na odziedziczenie przez potomstwo uszkodzeń DNA, które prowadzi do negatywnych skutków zdrowotnych [111,119,137–146]. W następnych częściach tego rozdziału zostanie wyjaśnione, dlaczego zaawansowany wiek rodziców oraz ART niosą ze sobą wysokie ryzyko uszkodzeń DNA zarodka, w jaki sposób uszkodzenia te negatywnie wpływają na rozwój zarodka i potomstwa oraz jak można ograniczać uszkodzenia DNA.

AKUMULACJA USZKODZEŃ DNA W GAMETACH POCHODZĄCYCH OD OSÓB W ZAAWANSOWANYM WIEKU ROZRODCZYM

U mężczyzn w zaawansowanym wieku rozrodczym zaobserwowano wyższy poziom fragmentacji DNA w plemnikach oraz ich zmniejszoną ruchliwość [137]. Może się to wiązać ze stopniowymi zmianami w męskim układzie rozrodczym, takimi jak powiększenie prostaty oraz zmniejszona zawartość białka i wody w nasieniu [138]. Wzrost uszkodzeń DNA w plemnikach starszych mężczyzn jest spowodowany stresem [139]. Plemniki starzejących się mężczyzn mogą również gromadzić mutacje DNA z powodu przypadkowych błędów wprowadzanych przez polimerazę DNA [140].

Od urodzenia do okresu dojrzewania komórki jajowe pozostają w stanie uśpienia, co czyni je podatnymi na uszkodzenia DNA [141]. Dojrzała komórka jajowa ma silną zdol-

ność naprawy DNA, a po jej zapłodnieniu przez plemnik, jest w stanie naprawić jego ewentualne uszkodzenia [142]. Jednak wysoki poziom uszkodzenia DNA plemnikowego prowadzi do upośledzenia rozwoju embrionalnego i poronienia [74]. Zdolność naprawy DNA oocytów zmniejsza się wraz z wiekiem samicy [143]. Zaawansowany wiek matki wiąże się z obniżonymi wskaźnikami zapłodnienia, a także ze zwiększonym ryzykiem występowania nieprawidłowości chromosomowych. Na przykład prawdopodobieństwo wystąpienia zespołu Downa (Trisomia chromosomu 21) jest silnie skorelowane z wiekiem matki [52,144,145]. Obniżająca się wraz ze starzeniem jakość oocytów, charakteryzuje się zmianami morfologicznymi [146] oraz zwiększoną podatnością na stres tlenowy i uszkodzenia DNA [141]. Badania na myszach wykazały, że oocyty starszych samic mają zmniejszoną zdolność do naprawy uszkodzonego DNA w porównaniu z młodszymi samicami [147]. Podsumowując, w zaawansowanym wieku następuje upośledzenie naturalnych mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA w komórkach rozrodczych.

PROCEDURY ART A ŹRÓDŁA USZKODZEŃ DNA

Zarodki utrzymywane w niefizjologicznych warunkach *in vitro* mogą być narażone na niebezpieczne poziomy światła widzialnego i UV [148]. Światło widzialne i ultrafioletowe indukuje zmiany w składzie pożywek hodowlanych oraz prowadzi do uszkodzenia DNA w komórkach embrionalnych [149]. Ponadto parametry jakości powietrza w laboratoriach ART (takie jak stężenie dwutlenku azotu, ozonu i cząstek stałych) mogą bezpośrednio wpływać na zarodki *in vitro* [150]. Wyposażenie i ściany laboratoriów mogą uwalniać lotne związki organiczne, z oparów farb, uszczelniaczy, wyrobów z tworzyw sztucznych itp. [151]. Obecnie wiele laboratoriów ART dokładnie reguluje jakość powietrza za pomocą filtrów, takich jak HEPA i ULPA, co skutkuje lepszą jakością powietrza niż większość sal operacyjnych [152]. Głównym problemem pozostają jednak opisane w poprzednim rozdziale same procedury ART. Już samo odizolowanie komórek rozrodczych z ich naturalnego środowiska zwiększa ryzyko stresu tlenowego i uszkodzeń DNA: na przykład plemniki po odwirowaniu są pozbawione bogatych w enzymy przeciwutleniające komponentów ejakulatu [153]. Również płyn pęcherzykowy w którym naturalnie dojrzewa komórka jajowa, zawiera wysoki poziom przeciwutleniaczy, chroniąc przed ROS [154,155]. Wielu ekspertów ART uważa, że dodanie przeciwutleniaczy do pożywek pomaga chronić komórki rozrodcze i zarodki przed uszkodzeniem spowodowanym przez ROS [117].

PERSPEKTYWY

Pomimo rosnącego rozpoznania wpływu zaawansowanego wieku rodzicielskiego oraz ART na zwiększone ryzyko występowania tlenowego oraz uszkodzeń DNA w gametach i zarodkach, w warunkach laboratoryjnych raczej nie stosuje się technik zmniejszających poziom uszkodzeń DNA. Oprócz wspomnianego powyżej dodatku przeciwutleniaczy do pożywek hodowlanych [117] oraz zalecania zdrowego trybu życia u pacjentów – osób pragnących poddać się procedurom ART w celu poczęcia dziecka, nie ma opracowanych procedur chroniących przed negatywnymi

konsekwencjami uszkodzeń DNA w zarodkach. Najskuteczniejszym sposobem zminimalizowania ryzyka odziedziczenia przez potomstwo uszkodzeń DNA pozostaje więc selekcja komórek o najniższym poziomie uszkodzeń oraz ich naprawa. Zaczniemy od możliwości oceny i selekcji komórki jajowej. Jak dotychczas nie ma konsensusu co do tego, które parametry powinny być oceniane w celu określenia żywotności komórki jajowej lub zarodka, a rutynowa ocena oparta jest na charakterystyce morfologicznej komórki/komórek przy użyciu mikroskopii świetlnej [156]. Jak można sobie wyobrazić, taką metodę znamionuje nie tylko spora subiektywność i uzależnienie od poziomu doświadczenia i zdolności obserwacyjnych danego embriologa klinicznego, ale ogólnie niewielka wartość poznawcza, z uwagi na bardzo ograniczoną możliwość wykrycia ewentualnej dysfunkcji komórki.

Jedną z możliwości analiz żywotności komórki jajowej lub zarodka, bez narażania ich na dodatkowy stres, jest analiza zużytej pożywki hodowlanej, która może dostarczyć wielu ważnych wskazówek na temat metabolizmu komórkowego. Parametry metaboliczne, takie jak ilość i rodzaj pobranych składników odżywczych oraz ilość i rodzaj uwalnianych aminokwasów do pożywki można wykorzystać do oceny które komórki jajowe/zarodki mają większe szanse na przeżycie [157]. Długoletnie badania zespołu Prof. Henry'ego Leese sugerują, że silnie uszkodzone zarodki zużywają więcej zasobów energetycznych na procesy naprawcze, a w konsekwencji różnią się metabolizmem w porównaniu z nieszkodzonymi zarodkami [158].

Innym potencjalnym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym nietoksyczną i bezinwazyjną diagnostykę komórki jajowej jest spektroskopia Ramana. Technika ta jest optymalna do stosowania w embriologii, ponieważ może generować szeroki zakres informacji w krótkim czasie ekspozycji. Spektroskopia Ramana jest nowatorską techniką i nie jest jeszcze stosowana w laboratoriach ART, choć ostatnie badania wykazały jej skuteczność w wykrywaniu zmian białek i kropli lipidowych w komórkach jajowych oraz zarodkach, a także objawów stresu tlenowego w oocytach [159,160].

Komórki jajowe charakteryzują się stosunkowo dużą ilością kropli lipidowych w porównaniu z większością komórek somatycznych, co predysponuje je niejako do ewentualnych uszkodzeń spowodowanych lipo-toksycznością w wyniku których komórka jajowa zmniejsza lub zupełnie traci potencjał rozwoju. Następstwem peroksydacji lipidów wywołanej przez nadmiar ROS, jest grupowanie się kropli lipidowych w cytoplazmie (ang. *lipid clusters*). Zaobserwowaliśmy zwiększony rozmiar kropli (klastrów) lipidowych w komórkach jajowych samic w zaawansowanym wieku oraz w komórkach jajowych w których sztucznie indukowany był stres oksydacyjny (przy pomocy H₂O₂) [Bisogno et al., w przygotowaniu]. Usunięcie lipidów z komórek jajowych (delipidacja) może zapobiec ich peroksydacji i zatrzymać dalsze uszkodzenia spowodowane stresem tlenowym [161-163].

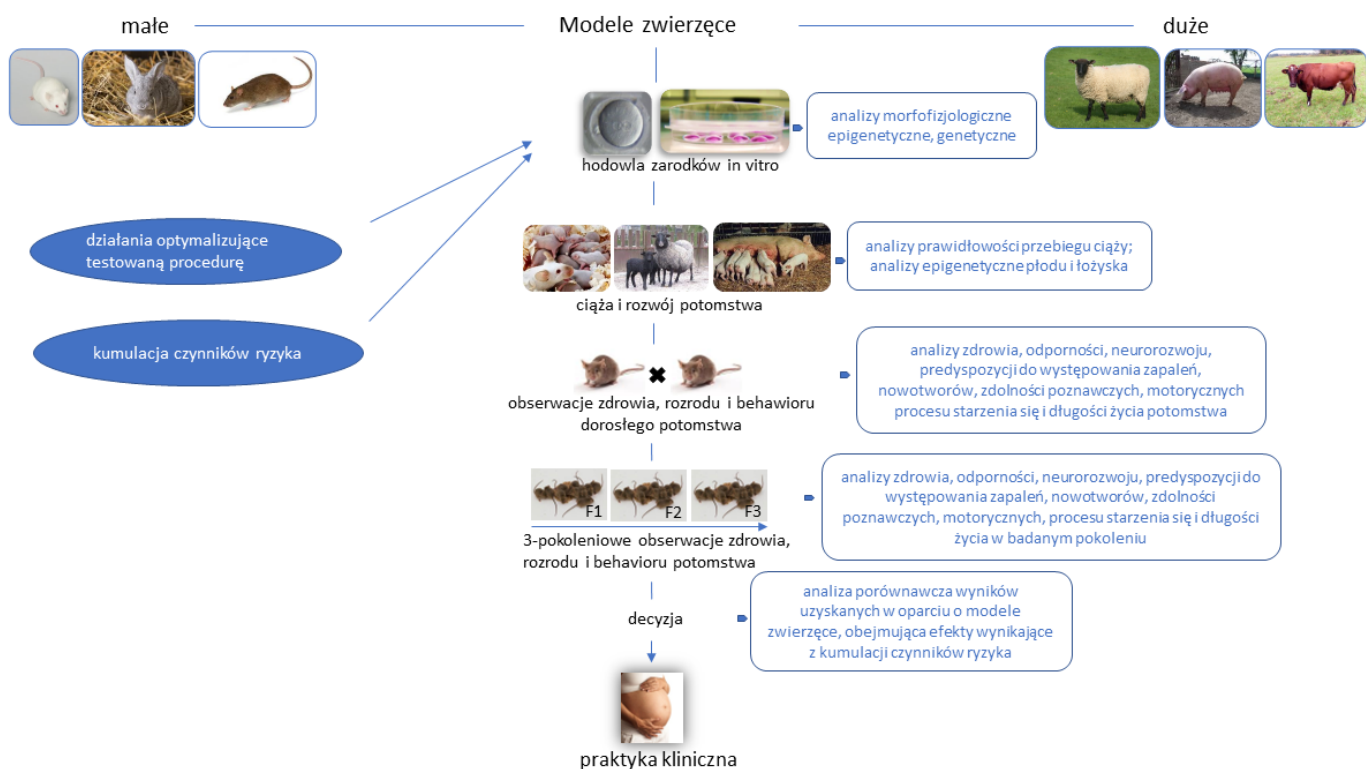
Inną metodą poprawy potencjału rozwojowego komórki jajowej może być usunięcie dysfunkcyjnych mitochondriów.

Z wiekiem kobiety uszkodzenia mitochondrialnego DNA (mtDNA) mogą spowodować upośledzenie funkcji organeli, co powoduje że mitochondria produkują nadmierną ilość ROS. Dysfunkcyjne mitochondria częściej występują u osób w zaawansowanym wieku [119]. Nowe techniki edycji genomu, takie jak CRISPR, TALENs i nukleazy cynkowo-palcowe (ZFN), są zdolne do modyfikowania mtDNA i naprawy uszkodzonych sekwencji [164,165]. Jednak ta technologia jest wciąż na wczesnym etapie rozwoju i na razie daleka od szerokiego wprowadzenia do laboratoriów ART. Testowane są również metody polegające na dodawaniu (iniekcji do ooplazmy) nieszkodzonych mitochondriów pochodzących z innych komórek, jednak również te techniki jak dotychczas nie okazały się efektywne ani wystarczająco bezpieczne [166].

UWAGI KOŃCOWE

Według hipotezy o rozwojowej podstawie zdrowia i chorób (ang. *Developmental Origin of Health and Disease*, DOHaD) warunki wczesnego rozwoju, w tym prenatalna ekspozycja na niekorzystne czynniki środowiskowe, odgrywają ważną rolę w formowaniu przyszłego stanu zdrowia potomstwa i mogą wpływać na pojawienie się chorób chronicznych w dorosłym życiu [167]. W tym kontekście, istnieje ogromna potrzeba lepszego zrozumienia podstawowych mechanizmów zmian metabolicznych oraz sercowo-naczyniowych wywołanych przez zaawansowany wiek rodziców i ART [95]. Często osoby które decydują się na ART, są również w zaawansowanym wieku rozrodczym. Kumulacja tych czynników ryzyka może prowadzić do ilościowego nasilenia się ich negatywnych efektów, zwiększyć ich intensywność oraz prowadzić do pojawienia się dodatkowych dotąd nieopisanych zaburzeń. Niestety, brakuje badań prowadzących do jednoznacznego określenia bezpieczeństwa lub ryzyka danej procedury ART w połączeniu z innym czynnikiem (wiek, choroba matki) wpływającym na prawidłowy przebieg ciąży. Dlatego, niezależnie w jakim stopniu zwiększone ryzyko powstawania chorób przewlekłych u dzieci poczętych w wyniku ART będzie można przypisać czynnikom związanym z procedurami ART *per se*, a w jakim, współtowarzyszącym czynnikom rodzicielskim, badania na zwierzętach będące obecnie jedyną drogą prowadzącą do jednoznacznego doświadczalnego wykazania bezpieczeństwa lub ryzyka danego czynnika czy procedury, powinny być rozwijane (Ryc. 1).

Jak już wspomniano, same procedury ART mogą powodować uszkodzenia gamet i zarodków, dlatego obecnie zaleca się w przypadkach gdzie jest to możliwe, wybór najmniej inwazyjnej techniki. Testowanie szczególnie inwazyjnych procedur ART, np. docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ang. *Intra-Cytoplasmic Sperm Injection*, ICSI) lub biopsji zarodka przy użyciu modeli zwierzęcych, umożliwiłoby uzyskanie obiektywnych informacji o wpływie danej procedury na długoterminowe zdrowie potomstwa, jeszcze przed jej wprowadzeniem do praktyki klinicznej. Niestety, te inwazyjne procedury ART były stosowane praktycznie bez ograniczeń od wielu lat. Dopiero teraz badania wykazują że ich użycie wiąże się z występowaniem znaczących zaburzeń epigenetycznych w ludzkich łożyskach (co jak wiadomo jest wskaźnikiem występowania późniejszych cho-



Rycina 1. Kolejność badań doświadczalnych umożliwiającą kompletną weryfikację bezpieczeństwa i ryzyka procedur ART przed ich wprowadzeniem do praktyki klinicznej

rób) [103]. Dopiero od bardzo niedawna zaczęto rozważać wybór mniej inwazyjnych procedur ART. Jeszcze kilka lat temu, użycie procedury ICSI, z uwagi na dużą efektywność zapłodnienia, było rutyną, niezależnie od typu niepłodności diagnozowanej u pary, tj. niezależnie od konieczności jej zastosowania. Niestety, wiele klinik do chwili obecnej stosuje ICSI rutynowo, bez względu na podłoże zdiagnozowanej niepłodności tj. bez względu na realną konieczność jej zastosowania. Również biopsja zarodka (stosowana w celu pobrania pojedynczych komórek do diagnostyki chorób genetycznych) została bezpośrednio wprowadzona do praktyki klinicznej. Dopiero później badania na zwierzętach wykazały znaczące problemy metaboliczne i inne u dorosłego już potomstwa uzyskanego po wykonaniu biopsji zarodka [168,169].

Innym przykładem ignorowania negatywnych dla zdrowia dzieci efektów ART, wykazanych uprzednio na modelach zwierzęcych jest wprowadzenie wydłużonej hodowli zarodków – do stadium blastocysty. U owiec i bydła, już około 30 lat temu zostały szczegółowo opisane efekty hodowli zarodków aż do osiągnięcia stadium blastocysty (ok. 6–7 dni), znane jako „large offspring syndrome” obejmujące zwiększoną masę ciała płodu i wynikające z tego powikłania w życiu postnatalnym, m. in. problemy metaboliczne i naczyniowo sercowe [170–173]. W owych czasach hodowlę zarodków ludzkich prowadzono krócej (1–3 dni). Dopiero później rozpoczęto dłuższą (6–7-dniową) hodowlę zarodków ludzkich do stadium blastocysty. Zaś, w zeszłym roku doczekaliśmy się szczegółowych opracowań wykazujących, że problem zwiększonej masy płodu i wynikających z tego

powikłań pourodzeniowych, ma miejsce również w przypadku wydłużonej hodowli zarodków ludzkich [174,175]. Nasuwa się pytanie: czy można było uniknąć tych problemów u ludzi i nie stosować wydłużonej hodowli zarodków ludzkich w oparciu o wcześniejsze alarmujące wyniki prac na zwierzętach?

Jak wspomniano, niektóre badania epidemiologiczne donoszą, że zaburzenia ciąży oraz problemy zdrowotne dzieci urodzonych w wyniku ART są związane z samymi zaburzeniami płodności rodziców (wywołanymi przez patologie takie jak cukrzyca, otyłość lub przez wymieniony już w tym opracowaniu zaawansowany wiek rodziców), przypisując samemu ART mniejsze znaczenie lub jego brak [176–178]. Najbardziej prestiżowe czasopisma medyczne, takie jak *Lancet*, wskazują iż ryzyko chorób u dzieci poczętych w wyniku ART łączyć należy z niepłodnością rodziców [57]. Nie należy jednak tego doniesienia interpretować w sposób negujący wpływ samego ART. To niestety się zdarza i jest o tyle niebezpieczne, że w połączeniu z podważaniem ważności wyników badań na zwierzętach (lub ich ignorowaniu czy nieznanymi) w kontekście stosowania ART u ludzi, takie stanowisko *de facto* blokuje dalsze rozpoznanie ewentualnych patologii mogących być wynikiem ART. Pomimo, że w fachowej literaturze naukowej dotyczącej badań konsekwencji ART, waga badań na modelach zwierzęcych na ogół nie jest kwestionowana, w praktyce autorzy niejednokrotnie borykali się z krytyką celowości prowadzenia badań nad wpływem ART przy użyciu modeli zwierzęcych np. podczas konferencji medycznych. Co więcej, w Polsce od kilku lat w recenzjach projektów naukowych wręcz

negowana bywa użyteczność doświadczeń na modelach zwierzęcych. Rozbrajająca wręcz jest argumentacja niektórych recenzentów sugerujących że np. skoro urodziło się już prawie 8 milionów zdrowych dzieci przy użyciu ART to nie ma co badać myszy. W ten sposób, bezimienna „soft power” (recenzenci projektów są anonimowi) blokuje określone linie rozwoju projektów badawczych ukierunkowane na badania konsekwencji ART. W niektórych krajach np. w Holandii, dochodzi już do takiej sytuacji, że pomimo otrzymania funduszy na badania w ramach prestiżowych projektów europejskich, lokalna komisja etyczna odmawia zgody naukowcom na przeprowadzenie badań na zwierzętach, kwestionując ich wartość merytoryczną – a więc w zasadzie kwestionując uprzednią ewaluację projektu badawczego przez wyspecjalizowanych w temacie naukowców.

Niekorzystny wpływ procedur ART na zdrowie potomstwa był badany przy użyciu wielu gatunków ssaków [4,179]. Jak wynika z dostępnej literatury, również przytoczonej w tym opracowaniu, generalnie wykryte zaburzenia u dzieci poczętych w wyniku ART są odzwierciedleniem podobnych, obserwowanych na modelach zwierzęcych. Na przykład opisane w poprzednich częściach pracy uwarunkowane użyciem ART zmiany struktury serca i naczyń krwionośnych obserwowane już podczas rozwoju płodowego były obserwowane jednakowo u człowieka, owcy i myszy [11–13,51,52,57,79–81]. Nawet tak różne gatunki jak żaba i owca wykazują podobny fenotyp będący efektem manipulacji oocytów (iniekcji komórek somatycznych) w odniesieniu do zaburzeń epigenetycznych i przeżywalności potomstwa [180]. Dotychczas nie doniesiono o gatunkowo-specyficznym wpływie ART warunkującym dane zaburzenie. Nie należałoby się tego spodziewać ponieważ mechanizmy regulujące wczesne etapy rozwoju zarodka są ewolucyjnie zachowane, a więc podobne u wszystkich ssaków. Taka opinia jednak, choć tak oczywista dla każdego biologa, nie jest tak samo akceptowana przez osoby nie operujące w obrębie nauk biologicznych. Człowiek nie operujący w dziedzinie nauk o życiu, lub też o wykształceniu wybitnie antropocentrycznym, jak w przypadku nauk medycznych, może nie brać pod uwagę tego że mechanizmy rozwoju zarodka są zachowane ewolucyjnie, tj. nie różnią się znacząco. Powoływanie się niejako *a priori* na domniemane różnice międzygatunkowe w konsekwencjach ART dla potomstwa, jako rzekome ograniczenie wartości badań na zwierzętach, ich rozmaite kwestionowanie, może okazać się niebezpieczne. U ludzi przecież nie można przeprowadzić tego typu doświadczeń. Podważając doniosłość testów na zwierzętach, prowadzi się *de facto* do ich zaprzestania.

Z tego względu, koniecznym jest odpowiednie odniesienie się do wyników badań na zwierzętach jako do jedyne go dostępnego źródła weryfikacji efektów ART dla potomstwa, przed ich wprowadzeniem do rutyny klinicznej. Badania na zwierzętach pomogą szczegółowo określić mechanizmy prowadzące do zmian epigenetycznych, jak i te związane ze stresem tlenowym oraz uszkodzeniami DNA. Jeśli po rzetelnym przetestowaniu danej procedury ART na dwu, trzech lub czterech gatunkach zwierząt zaobserwujemy negatywny efekt danej procedury dla zdrowia potomstwa, to należy się głęboko zastanowić czy istnieją wystarczające przesłanki, żeby pomimo tych wyników wdrażać daną pro-

cedurę do rozrodu wspomaganego u ludzi. Najbezpieczniej byłoby jej nie wdrażać. Jeśli zaś okazałoby się, że badania na modelach zwierzęcych nie wykazały żadnego negatywnego efektu testowanej procedury, to wówczas dopiero można, a nawet należy rozważyć ewentualne różnice międzygatunkowe, biorąc pod uwagę, że pomimo braku obserwacji dotyczących zaburzeń na modelach zwierzęcych nie mamy gwarancji podobnego sukcesu u ludzi. Dopiero ten moment badań wskazuje na konieczność brania pod uwagę ograniczeń wynikających z uzyskanych na modelach zwierzęcych wyników.

WNIOSEK

Ustalenie związku między wiekiem rodziców oraz ART a niekorzystnymi konsekwencjami zdrowotnymi urodzonych dzieci jest wyzwaniem. Niejednorodność badanych populacji oraz czynniki dodatkowe takie jak współistniejąca choroba przewlekła matki, pochodzenie etniczne, zastosowana procedura ART, oraz, wspomniana wrażliwość osobnicza na czynniki środowiskowe wpływające na zmiany epigenetyczne („outlier group”), odzwierciedla różnice w informacji o przebiegu ciąży oraz stanu zdrowia dzieci urodzonych w wyniku ART. Ponieważ pełne ujawnienie konsekwencji zdrowotnych u ludzi poczętych w wyniku ART może potrwać dziesięciolecia, dlatego badania doświadczalne wykonywane na modelach zwierzęcych, są niezbędne. Testowanie ART przy użyciu modeli zwierzęcych stanowi jedyną możliwą weryfikację doświadczalną tych procedur, której z oczywistych względów etycznych, nie można przeprowadzać bezpośrednio na ludziach. Właśnie dlatego wnikliwie długoterminowe badania na zwierzętach, umożliwiające określenie odpowiedniego kierunku rozwoju ART, powinny być priorytetem zarówno dla badaczy jak i dla praktykujących lekarzy i embriologów klinicznych. Dopiero po zakończeniu testów można będzie interpretować domniemane różnice międzygatunkowe – jeśli takie będą miały miejsce, oraz inne ewentualne czynniki ograniczające translacyjny charakter wyników doświadczeń. Dopiero na takiej podstawie można będzie określić ewentualne ryzyko czy też poziom bezpieczeństwa określonej procedury ART. Ułatwi to znacznie opracowanie sposobów przewyższenia problemu i poprawi bezpieczeństwo stosowania ART u ludzi, oraz umożliwi działania naprawcze mające na celu zminimalizowanie bądź wykluczenie związanego z nim ryzyka.

PIŚMIENNICTWO

1. Chen Z, Xiong L, Jin H, et al (2021) Advanced maternal age causes premature placental senescence and malformation via dysregulated α -Klotho expression in trophoblasts. *Aging Cell* 20:e13417
2. Nybo Andersen A-M, Urhøj SK (2017) Is advanced paternal age a health risk for the offspring? *Fertil Steril* 107:312–318
3. Laopaiboon M, Lumbiganon P, Intarut N, Mori R, Ganchimeg T, Vogel JP, Souza JP, Gülmezoglu AM (2014) Advanced maternal age and pregnancy outcomes: a multicountry assessment. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 121:49–56
4. Duranthon V, Chavatte-Palmer P (2018) Long term effects of ART: What do animals tell us? *Mol Reprod Dev* 85:348–368
5. Bray I, Gunnell D (2006) Advanced paternal age: How old is too old? *J Epidemiol Community Health* 60:851–853

6. Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J, et al (2012) Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod Oxf Engl* 27:2571–2584
7. Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Nyboe Andersen A, ESHRE Reproduction and Society Task Force (2012) Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Hum Reprod Update* 18:29–43
8. Hayward CE, Greenwood SL, Sibley CP, Baker PN, Challis JRG, Jones RL (2012) Effect of maternal age and growth on placental nutrient transport: potential mechanisms for teenagers' predisposition to small-for-gestational-age birth? *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 302:E233–E242
9. Eroglu A, Layman LC (2012) Role of ART in imprinting disorders. *Semin Reprod Med* 30:92–104
10. Barry JS, Rozance PJ, Anthony RV (2008) An animal model of placental insufficiency-induced intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol* 32:225–230
11. Ptak GE, D'Agostino A, Toschi P, Fidanza A, Zacchini F, Czernik M, Monaco F, Loi P (2013) Post-implantation mortality of in vitro produced embryos is associated with DNA methyltransferase 1 dysfunction in sheep placenta. *Hum Reprod* 28:298–305
12. Fidanza A, Toschi P, Zacchini F, Czernik M, Palmieri C, Scapolo P, Modlinski JA, Loi P, Ptak GE (2014) Impaired placental vasculogenesis compromises the growth of sheep embryos developed in vitro. *Biol Reprod* 91:21
13. Toschi P, Czernik M, Zacchini F, Fidanza A, Loi P, Ptak GE (2016) Evidence of Placental Autophagy during Early Pregnancy after Transfer of In Vitro Produced (IVP) Sheep Embryos. *PLoS One* 11:e0157594
14. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, Slagboom PE, Heijmans BT (2009) DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 18:4046–4053
15. Veenendaal MVE, Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PMM, van der Post J a. M, Gluckman PD, Hanson MA, Roseboom TJ (2013) Trans-generational effects of prenatal exposure to the 1944–45 Dutch famine. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 120:548–553
16. Pinheiro AR, Salvucci IDM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2008) Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci Lond Engl* 114:381–392
17. Dupont C, Sifer C (2012) A Review of Outcome Data concerning Children Born following Assisted Reproductive Technologies. *ISRN Obstet Gynecol* 2012:405382
18. Lean SC, Heazell AEP, Dilworth MR, Mills TA, Jones RL (2017) Placental Dysfunction Underlies Increased Risk of Fetal Growth Restriction and Stillbirth in Advanced Maternal Age Women. *Sci Rep* 7:9677
19. Kahveci B, Melekoglu R, Evruke IC, Cetin C (2018) The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 18:343
20. Goisis A, Remes H, Barclay K, Martikainen P, Myrskylä M (2017) Advanced Maternal Age and the Risk of Low Birth Weight and Preterm Delivery: a Within-Family Analysis Using Finnish Population Registers. *Am J Epidemiol* 186:1219–1226
21. Biagioni EM, May LE, Broskey NT (2021) The impact of advanced maternal age on pregnancy and offspring health: A mechanistic role for placental angiogenic growth mediators. *Placenta* 106:15–21
22. Napso T, Hung Y-P, Davidge ST, Care AS, Sferruzzi-Perri AN (2019) Advanced maternal age compromises fetal growth and induces sex-specific changes in placental phenotype in rats. *Sci Rep* 9:16916
23. Nobili V, Alisi A, Panera N, Agostoni C (2008) Low birth weight and catch-up-growth associated with metabolic syndrome: a ten year systematic review. *Pediatr Endocrinol Rev PER* 6:241–247
24. Berends LM, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Cripps RL, Ozanne SE (2013) Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *Int J Obes* 37:1051–1057
25. Lammi N, Moltchanova E, Blomstedt P, Eriksson JG, Taskinen O, Sarti C, Tuomilehto J, Karvonen M (2007) The effect of birth order and parental age on the risk of type 1 and 2 diabetes among young adults. *Diabetologia* 50:2433–2438
26. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, et al (2010) Maternal age at birth and childhood type 1 diabetes: a pooled analysis of 30 observational studies. *Diabetes* 59:486–494
27. Fall CHD, Sachdev HS, Osmond C, et al (2015) Association between maternal age at childbirth and child and adult outcomes in the offspring: a prospective study in five low-income and middle-income countries (COHORTS collaboration). *Lancet Glob Health* 3:e341–e422
28. Lawlor DA, Najman JM, Sterne J, Williams GM, Ebrahim S, Davey Smith G (2004) Associations of parental, birth, and early life characteristics with systolic blood pressure at 5 years of age: findings from the Mater-University study of pregnancy and its outcomes. *Circulation* 110:2417–2423
29. Gillman MW, Rich-Edwards JW, Rifas-Shiman SL, Lieberman ES, Kleinman KP, Lipshultz SE (2004) Maternal age and other predictors of newborn blood pressure. *J Pediatr* 144:240–245
30. Cooke C-LM, Davidge ST (2019) Advanced maternal age and the impact on maternal and offspring cardiovascular health. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 317:H387–H394
31. Roberts VHJ, Frias AE, Grove KL (2015) Impact of Maternal Obesity on Fetal Programming of Cardiovascular Disease. *Physiology* 30:224–231
32. Borge TC, Aase H, Brantsæter AL, Biele G (2017) The importance of maternal diet quality during pregnancy on cognitive and behavioural outcomes in children: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7:e016777
33. Cooke C-LM, Shah A, Kirschenman RD, Quon AL, Morton JS, Care AS, Davidge ST (2018) Increased susceptibility to cardiovascular disease in offspring born from dams of advanced maternal age. *J Physiol* 596:5807–5821
34. Warshaviak M, Kalma Y, Carmon A, Samara N, Dviri M, Azem F, Ben-Yosef D (2019) The Effect of Advanced Maternal Age on Embryo Morphokinetics. *Front Endocrinol* 10:686
35. Cimadomo P, Fabozzi G, Vaiarelli A, Ubaldi N, Ubaldi FM, Rienzi L (2018) Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. *Front Endocrinol* 9:327
36. Velazquez MA, Smith CGC, Smyth NR, Osmond C, Fleming TP (2016) Advanced maternal age causes adverse programming of mouse blastocysts leading to altered growth and impaired cardiometabolic health in post-natal life. *Hum Reprod Oxf Engl* 31:1970–1980
37. Halvaei I, Litzky J, Esfandiari N (2020) Advanced paternal age: effects on sperm parameters, assisted reproduction outcomes and offspring health. *Reprod Biol Endocrinol* 18:110
38. Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M, Turki RF (2015) Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol* 13:35
39. Alio AP, Salihu HM, McIntosh C, August EM, Weldeselasse H, Sanchez E, Mbah AK (2012) The effect of paternal age on fetal birth outcomes. *Am J Mens Health* 6:427–435
40. du Fossé NA, van der Hoorn M-LP, van Lith JMM, le Cessie S, Lashley EELO (2020) Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 26:650–669
41. Harlap S, Paltiel O, Deutsch L, Knaanie A, Masalha S, Tiram E, Caplan LS, Malaspina D, Friedlander Y (2002) Paternal age and preeclampsia. *Epidemiol Camb Mass* 13:660–667
42. Brandt JS, Ithier MAC, Rosen T, Ashkinadze E (2019) Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenat Diagn* 39:81–87
43. Mao Y, Zhang C, Wang Y, Meng Y, Chen L, Dennis C-L, Sheng J, Wu Y, Huang H (2021) Association Between Paternal Age and Birth Weight in Preterm and Full-Term Birth: A Retrospective Study. *Front Endocrinol* 12:706369

44. Khandwala YS, Baker VL, Shaw GM, Stevenson DK, Lu Y, Eisenberg ML (2018) Association of paternal age with perinatal outcomes between 2007 and 2016 in the United States: population based cohort study. *BMJ* 363:k4372
45. Eriksen W, Sundet JM, Tambs K (2013) Paternal age at birth and the risk of obesity in young adulthood: a register-based birth cohort study of Norwegian males. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc* 25:29-34
46. Ahn HY, Hwang IC (2019) Paternal age at birth and metabolic risk factors in adolescents: a nationwide survey. *Public Health* 175:1-3
47. Savage T, Derraik JGB, Miles HL, Mouat F, Hofman PL, Cutfield WS (2014) Increasing paternal age at childbirth is associated with taller stature and less favourable lipid profiles in their children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 80:253-260
48. Zhao W-L, Gu N-H, Li Z-Z, Wang G-S, Cheng CY, Sun F (2020) Autism-like behaviors and abnormality of glucose metabolism in offspring derived from aging males with epigenetically modified sperm. *Aging* 12:19766-19784
49. Caballero-Campo P, Lin W, Simbulan R, Liu X, Feuer S, Donjacour A, Rinaudo PF (2018) Advanced Paternal Age Affects Sperm Count and Anogenital Distance in Mouse Offspring. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 25:515-522
50. Pontesilli M, Painter RC, Grooten IJ, van der Post JA, Mol BW, Vrijotte TGM, Repping S, Roseboom TJ (2015) Subfertility and assisted reproduction techniques are associated with poorer cardiometabolic profiles in childhood. *Reprod Biomed Online* 30:258-267
51. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JPW, van Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA (2008) Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1682-1688
52. Chen M, Wu L, Zhao J, Wu F, Davies MJ, Wittert GA, Norman RJ, Robker RL, Heilbronn LK (2014) Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF. *Diabetes* 63:3189-3198
53. Sakka SD, Loutradis D, Kanaka-Gantenbein C, Margeli A, Papastamati M, Papassotiriou I, Chrousos GP (2010) Absence of insulin resistance and low-grade inflammation despite early metabolic syndrome manifestations in children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 94:1693-1699
54. Green MP, Mouat F, Miles HL, Hopkins SA, Derraik JGB, Hofman PL, Peek JC, Cutfield WS (2013) Phenotypic differences in children conceived from fresh and thawed embryos in in vitro fertilization compared with naturally conceived children. *Fertil Steril* 99:1898-1904
55. Belva F, Henriot S, Liebaers I, Van Steirteghem A, Celestin-Westreich S, Bonduelle M (2007) Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born >or=32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group. *Hum Reprod Oxf Engl* 22:506-515
56. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Roos JC, Vermeiden JPW, van Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA (2007) Body composition in children and adolescents born after in vitro fertilization or spontaneous conception. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3417-3423
57. Goisis A, Remes H, Martikainen P, Klemetti R, Myrskylä M (2019) Medically assisted reproduction and birth outcomes: a within-family analysis using Finnish population registers. *Lancet Lond Engl* 393:1225-1232
58. Scott KA, Yamazaki Y, Yamamoto M, Lin Y, Melhorn SJ, Krause EG, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR, Tamashiro K (2010) Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 83:220-227
59. Donjacour A, Liu X, Lin W, Simbulan R, Rinaudo PF (2014) In vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. *Biol Reprod* 90:80
60. Zheng MM, Cao HR, Zhang WY, Yan PP, Xu JY, Zhao HL, Zhu F, Zhang JJ, Li Y, Zhu H (2018) Abnormal gene methylation during embryonic development after preimplantation genetic testing increases risk of liver-derived insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1425:70-81
61. Feuer SK, Liu X, Donjacour A, et al (2014) Use of a mouse in vitro fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis. *Endocrinology* 155:1956-1969
62. Sjöblom C, Roberts CT, Wikland M, Robertson SA (2005) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology* 146:2142-2153
63. Rinaudo P, Liu X, Lin W, Simbulan R, Feuer S, Donjacour A (2012) Metabolic Differences in Serum and Liver Can Explain the Impaired Glucose Tolerance Found in Adult Mice Conceived by IVF. *Biol Reprod* 87:114-114
64. Gu L, Zhang J, Zheng M, Dong G, Xu J, Zhang W, Wu Y, Yang Y, Zhu H (2018) A potential high risk for fatty liver disease was found in mice generated after assisted reproductive techniques. *J Cell Biochem* 119:1899-1910
65. Mc Namara K, Alzubaidi H, Jackson JK (2019) Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integr Pharm Res Pract* 8:1-11
66. Care AS, Bourque SL, Morton JS, Hjartarson EP, Davidge ST (2015) Effect of Advanced Maternal Age on Pregnancy Outcomes and Vascular Function in the Rat. *Hypertension* 65:1324-1330
67. Ramírez-Vélez R, Correa-Bautista JE, Villa-González E, Martínez-Torres J, Hackney AC, García-Hermoso A (2017) Effects of preterm birth and fetal growth retardation on life-course cardiovascular risk factors among schoolchildren from Colombia: The FUPRECOL study. *Early Hum Dev* 106-107:53-58
68. Allport SA, Kikah N, Abu Saif N, Ekokobe F, Atem FD (2016) Parental Age of Onset of Cardiovascular Disease as a Predictor for Offspring Age of Onset of Cardiovascular Disease. *PLoS One* 11:e0163334
69. Shah A, Cooke C-LM, Kirschenman RD, Quon AL, Morton JS, Care AS, Davidge ST (2018) Sex-specific effects of advanced maternal age on cardiovascular function in aged adult rat offspring. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 315:H1724-H1734
70. Grewal J, Carmichael SL, Yang W, Shaw GM (2012) Paternal age and congenital malformations in offspring in California, 1989-2002. *Matern Child Health J* 16:385-392
71. Jørgensen G (1968) [Genetic investigations in functional obstructive subvalvular aortic stenosis (irregular hypertrophic cardiomyopathy)]. *Humangenetik* 6:13-28
72. Momand JR, Xu G, Walter CA (2013) The paternal age effect: a multifaceted phenomenon. *Biol Reprod* 88:108
73. Olshan AF, Schnitzer PG, Baird PA (1994) Paternal age and the risk of congenital heart defects. *Teratology* 50:80-84
74. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI (2009) Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32:46-56
75. Harris ID, Fronczak C, Roth L, Meacham RB (2011) Fertility and the aging male. *Rev Urol* 13:e184-190
76. Scherrer U, Rimoldi SF, Rexhaj E, et al (2012) Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *Circulation* 125:1890-1896
77. Valenzuela-Alcaraz B, Crispi F, Bijns B, Cruz-Lemini M, Creus M, Sitges M, Bartrons J, Civico S, Balasch J, Gratacós E (2013) Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally. *Circulation* 128:1442-1450
78. Rimoldi SF, Sartori C, Rexhaj E, Cerny D, Arx RV, Soria R, Germond M, Allemann Y, Scherrer U (2014) Vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies: underlying mechanisms and future implications. *Swiss Med Wkly*. <https://doi.org/10.4414/smw.2014.13973>
79. Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, Wilkins A, Eckert JJ, Kwong WY, Osmond C, Hanson M, Fleming TP (2007) Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc Natl Acad Sci* 104:5449-5454
80. Rexhaj E, Paoloni-Giacobino A, Rimoldi SF, Fuster DG, Anderegg M, Somm E, Bouillet E, Allemann Y, Sartori C, Scherrer U (2013) Mice generated by *in vitro* fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. *J Clin Invest* 123:5052-5060
81. Ramirez-Perez FI, Schenewerk AL, Coffman KL, Foote C, Ji T, Rivera RM, Martinez-Lemus LA (2014) Effects of the Use of Assisted Reproductive Technologies and an Obesogenic Environment on Resistance

- Artery Function and Diabetes Biomarkers in Mice Offspring. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112651>
82. Wang Q, Zhang Y, Le F, et al (2018) Alteration in the expression of the renin-angiotensin system in the myocardium of mice conceived by in vitro fertilization. *Biol Reprod* 99:1276–1288
 83. Scherrer U, Rexhaj E, Allemann Y, Sartori C, Rimoldi SF (2015) Cardiovascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *Eur Heart J* 36:1583–1589
 84. Adkins RM, Thomas F, Tylavsky FA, Krushkal J (2011) Parental ages and levels of DNA methylation in the newborn are correlated. *BMC Med Genet* 12:47
 85. Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, Goughan JP, Coutifaris C, Sapienza C (2009) DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet* 18:3769–3778
 86. Nelissen ECM, Van Montfort APA, Smits LJM, Menheere PPCA, Evers JLH, Coonen E, Derhaag JG, Peeters LL, Coumans AB, Dumoulin JCM (2013) IVF culture medium affects human intrauterine growth as early as the second trimester of pregnancy. *Hum Reprod* 28:2067–2074
 87. Feinberg JI, Bakulski KM, Jaffe AE, et al (2015) Paternal sperm DNA methylation associated with early signs of autism risk in an autism-enriched cohort. *Int J Epidemiol* 44:1199–1210
 88. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci* 105:17046–17049
 89. Frans EM, Sandin S, Reichenberg A, Långström N, Lichtenstein P, McGrath JJ, Hultman CM (2013) Autism Risk Across Generations: A Population Based Study of Advancing Grandpaternal and Paternal Age. *JAMA Psychiatry* Chic Ill 70:516–521
 90. Richardson B (2003) Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2:245–261
 91. Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MRW (2010) Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 19:36–51
 92. Fortier AL, Lopes FL, Darricarrère N, Martel J, Trasler JM (2008) Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum Mol Genet* 17:1653–1665
 93. Mani S, Ghosh J, Coutifaris C, Sapienza C, Mainigi M (2020) Epigenetic changes and assisted reproductive technologies. *Epigenetics* 15:12–25
 94. Bloise E, Feuer SK, Rinaudo PF (2014) Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human reproductive medicine and animal breeding. *Hum Reprod Update* 20:822–839
 95. Vrooman LA, Bartolomei MS (2017) Can assisted reproductive technologies cause adult-onset disease? Evidence from human and mouse. *Reprod Toxicol Elmsford N* 68:72–84
 96. Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A, von Düring V, Skjaerven R, Vatten LJ (2006) Increased risk of placenta previa in pregnancies following IVF/ICSI; a comparison of ART and non-ART pregnancies in the same mother. *Hum Reprod Oxf Engl* 21:2353–2358
 97. de Waal E, Vrooman LA, Fischer E, Ord T, Mainigi MA, Coutifaris C, Schultz RM, Bartolomei MS (2015) The cumulative effect of assisted reproduction procedures on placental development and epigenetic perturbations in a mouse model. *Hum Mol Genet* 24:6975–6985
 98. Qin J, Liu X, Sheng X, Wang H, Gao S (2016) Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: a meta-analysis of cohort studies. *Fertil Steril* 105:73–85.e1–6
 99. Choux C, Carmignac V, Bruno C, Sagot P, Vaiman D, Fauque P (2015) The placenta: phenotypic and epigenetic modifications induced by Assisted Reproductive Technologies throughout pregnancy. *Clin Epigenetics* 7:87
 100. Almasi-Hashiani A, Omani-Samani R, Mohammadi M, Amini P, Navid B, Alizadeh A, Khedmati Morasae E, Maroufizadeh S (2019) Assisted reproductive technology and the risk of preeclampsia: an updated systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 19:149
 101. Romanenko TG, Sulimenko OM (2020) Prevention of preeclampsia in women with multiple pregnancy after assisted reproduction. *Wiadomosci Lek Wars Pol* 1960 73:494–497
 102. Ghosh J, Mainigi M, Coutifaris C, Sapienza C (2016) Outlier DNA methylation levels as an indicator of environmental exposure and risk of undesirable birth outcome. *Hum Mol Genet* 25:123–129
 103. Choufani S, Turinsky AL, Melamed N, et al (2019) Impact of assisted reproduction, infertility, sex and paternal factors on the placental DNA methylome. *Hum Mol Genet* 28:372–385
 104. Chatterjee S, Hossain U, Sil PC (2019) Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Autophagy in Cardiovascular Disease: Its Pathogenesis and Amelioration by Different Small Natural Molecules. In: Chakraborti S, Dhalla NS, Dikshit M, Ganguly NK (eds) *Modul. Oxidative Stress Heart Dis*. Springer, Singapore, pp 457–487
 105. Ajith TA, Jayakumar TG (2014) Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World J Cardiol* 6:1091–1099
 106. Vaughan DA, Tirado E, Garcia D, Datta V, Sakkas D (2020) DNA fragmentation of sperm: a radical examination of the contribution of oxidative stress and age in 16945 semen samples. *Hum Reprod Oxf Engl* 35:2188–2196
 107. Koh S-A, Sanders K, Burton P (2016) Effect of male age on oxidative stress markers in human semen. *J Reprod Biotechnol Fertil* 5:2058915816673242
 108. Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J (2008) Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology* 71:490–494
 109. Aitken RJ, De Iuliis GN (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16:3–13
 110. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41:183–197
 111. Selvaratnam JS, Robaire B (2016) Effects of Aging and Oxidative Stress on Spermatozoa of Superoxide-Dismutase 1- and Catalase-Null Mice. *Biol Reprod*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.141671>
 112. Ko EY, Sabanegh ES, Agarwal A (2014) Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril* 102:1518–1527
 113. Janny L, Menezo YJ (1994) Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 38:36–42
 114. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Hotaling J, Carrell DT (2014) Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod Oxf Engl* 29:2402–2412
 115. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AAN, Sharma RK, Worley SE, Thornton J, Agarwal A (2004) Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 82:593–600
 116. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 3:28
 117. Agarwal A, Majzoub A (2017) Role of Antioxidants in Assisted Reproductive Techniques. *World J Mens Health* 35:77–93
 118. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG (2006) Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 86:503–512
 119. Bentov Y, Yavorska T, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF (2011) The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *J Assist Reprod Genet* 28:773–783
 120. Zhang D, Keilty D, Zhang ZF, Chian RC (2017) Mitochondria in oocyte aging: current understanding. *Facts Views Vis ObGyn* 9:29–38
 121. Zeng H, Ren Z, Yeung WSB, Shu Y, Xu Y, Zhuang G, Liang X-Y (2007) Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the

- absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl* 22:1681–1686
122. Howe K, FitzHarris G (2013) Recent Insights into Spindle Function in Mammalian Oocytes and Early Embryos. *Biol Reprod* 89:71, 1–9
 123. Marangos P, Stevense M, Niaka K, Lagoudaki M, Nabti I, Jessberger R, Carroll J (2015) DNA damage-induced metaphase I arrest is mediated by the spindle assembly checkpoint and maternal age. *Nat Commun* 6:8706
 124. Titus S, Li F, Stobezki R, et al (2013) Impairment of BRCA1-related DNA Double Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans. *Sci Transl Med* 5:172ra21
 125. Eichenlaub-Ritter U (2012) Oocyte ageing and its cellular basis. *Int J Dev Biol* 56:841–852
 126. Schon EA, Kim SH, Ferreira JC, Magalhães P, Grace M, Warburton D, Gross SJ (2000) Chromosomal non-disjunction in human oocytes: is there a mitochondrial connection? *Hum Reprod Oxf Engl* 15 Suppl 2:160–172
 127. Acton BM, Jurisicova A, Jurisica I, Casper RF (2004) Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod* 10:23–32
 128. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J (1995) ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod Oxf Engl* 10:415–424
 129. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S (2000) Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 15:2621–2633
 130. Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK, Sobey CG (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Front Biosci Landmark Ed* 16:1733–1745
 131. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD (2019) Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2019:e8563845
 132. Yang H, Kuhn C, Kolben T, Ma Z, Lin P, Mahner S, Jeschke U, von Schönfeldt V (2020) Early Life Oxidative Stress and Long-Lasting Cardiovascular Effects on Offspring Conceived by Assisted Reproductive Technologies: A Review. *Int J Mol Sci* 21:5175
 133. Rimoldi SF, Sartori C, Rexhaj E, et al (2015) Antioxidants improve vascular function in children conceived by assisted reproductive technologies: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur J Prev Cardiol* 22:1399–1407
 134. Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM (2004) Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 272:483–496
 135. Jaroudi S, SenGupta S (2007) DNA repair in mammalian embryos. *Mutat Res* 635:53–77
 136. Pacchierotti F, Ranaldi R, Derijck AA, van der Heijden GW, de Boer P (2011) In vivo repair of DNA damage induced by X-rays in the early stages of mouse fertilization, and the influence of maternal PARP1 ablation. *Mutat Res* 714:44–52
 137. Colasante A, Minasi MG, Scarselli F, Casciani V, Zazzaro V, Ruberti A, Greco P, Varricchio MT, Greco E (2019) The aging male: Relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time. *Arch Ital Urol Androl Organo Uff Soc Ital Ecogr Urol E Nefrol* 90:254–259
 138. Ausmees K, Korrovits P, Timberg G, Punab M, Mändar R (2013) Decline of seminal parameters in middle-aged males is associated with lower urinary tract symptoms, prostate enlargement and bladder outlet obstruction. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol* 39:727–740
 139. Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, et al (2018) The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA Assist Reprod* 22:323–330
 140. Gao Z, Wyman MJ, Sella G, Przeworski M (2016) Interpreting the Dependence of Mutation Rates on Age and Time. *PLOS Biol* 14:e1002355
 141. Mihalas BP, Redgrove KA, McLaughlin EA, Nixon B (2017) Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. *Oxid Med Cell Longev* 2017:4015874
 142. Martin JH, Aitken RJ, Bromfield EG, Nixon B (2019) DNA damage and repair in the female germline: contributions to ART. *Hum Reprod Update* 25:180–201
 143. Horta F, Catt S, Ramachandran P, Vollenhoven B, Temple-Smith P (2020) Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Hum Reprod Oxf Engl* 35:529–544
 144. Duncan FE, Gerton JL (2018) Mammalian oogenesis and female reproductive aging. *Aging* 10:162–163
 145. Hultén MA, Patel S, Jonasson J, Iwarsson E (2010) On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model. *Reprod Camb Engl* 139:1–9
 146. Sun X-L, Jiang H, Han D-X, Fu Y, Liu J-B, Gao Y, Hu S-M, Yuan B, Zhang J-B (2018) The activated DNA double-strand break repair pathway in cumulus cells from aging patients may be used as a convincing predictor of poor outcomes after in vitro fertilization-embryo transfer treatment. *PLoS One* 13:e0204524
 147. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MSH (2004) Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 13:2263–2278
 148. Boone WR, Higdon HL, Johnson JE (2010) Quality Management Issues in the Assisted Reproduction Laboratory. *J Reprod Stem Cell Biotechnol* 1:30–107
 149. Okano A, Saka N, Takahashi M, Kanai Y (1997) DNA damage in early hamster embryos exposed to fluorescent light. *Theriogenology* 47:310
 150. Legro RS, Sauer MV, Mottla GL, Richter KS, Li X, Dodson WC, Liao D (2010) Effect of air quality on assisted human reproduction. *Hum Reprod Oxf Engl* 25:1317–1324
 151. Worrilow KC, Huynh HT, Gwozdziewicz JB, Schillings WA, Peters AJ (2001) A retrospective analysis: the examination of a potential relationship between particulate (P) and volatile organic compound (VOC) levels in a class 100 IVF laboratory cleanroom (CR) and specific parameters of embryogenesis and rates of implantation (IR). *Fertil Steril* 3 Supplement 1:S15–S16
 152. Mortimer D (2005) A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. *Reprod Biomed Online* 11:162–176
 153. Alvarez JG, Storey BT (1989) Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 23:77–90
 154. Carbone MC, Tatone C, Monache SD, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F (2003) Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 9:639–643
 155. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P (2003) Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod Oxf Engl* 18:2270–2274
 156. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011) The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl* 26:1270–1283
 157. Sturmey RG, Hawkhead JA, Barker EA, Leese HJ (2009) DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Oxf Engl* 24:81–91
 158. Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ (2007) The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev* 74:1345–1353
 159. Bogliolo L, Murrone O, Di Emidio G, Piccinini M, Ariu F, Ledda S, Tatone C (2013) Raman spectroscopy-based approach to detect aging-related oxidative damage in the mouse oocyte. *J Assist Reprod Genet* 30:877–882

160. Perevedentseva E, Krivokharchenko A, Karmenyan AV, Chang H-H, Cheng C-L (2019) Raman spectroscopy on live mouse early embryo while it continues to develop into blastocyst in vitro. *Sci Rep* 9:6636
161. Bisogno S, Arena R, Fic K, Gąsior Ł, Ptak GE (2020) Lipid droplet utilization by the mouse embryo. *Biosci Proc.* <https://doi.org/10.1530/biosciproc.10.009>
162. Arena R, Bisogno S, Gąsior Ł, et al (2021) Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause. *Proc Natl Acad Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.2018362118>
163. Musson R, Gąsior Ł, Bisogno S, Ptak GE (2022) Musson R, Gąsior Ł, Bisogno S, and Ptak GE. DNA damage in preimplantation embryos and gametes: specification, clinical relevance and repair strategies. *W Druku*
164. Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, et al (2015) Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell* 161:459–469
165. Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M (2018) Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. *Trends Genet* 34:101–110
166. Labarta E, de Los Santos MJ, Herraiz S, Escribá MJ, Marzal A, Bugues A, Pellicer A (2019) Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization—a randomized pilot study. *Fertil Steril* 111:86–96
167. Barker DJP (2007) The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261:412–417
168. Sampino S, Zacchini F, Swiergiel AH, Modlinski AJ, Loi P, Ptak GE (2014) Effects of blastomere biopsy on post-natal growth and behavior in mice. *Hum Reprod* 29:1875–1883
169. Zacchini F, Arena R, Abramik A, Ptak GE (2017) Embryo biopsy and development: the known and the unknown. *Reprod Camb Engl* 154:R143–R148
170. Maxfield EK, Sinclair KD, Dunne LD, Broadbent PJ, Robinson JJ, Stewart E, Kyle DG, Maltin CA (1998) Temporary exposure of ovine embryos to an advanced uterine environment does not affect fetal weight but alters fetal muscle development. *Biol Reprod* 59:321–325
171. Young LE, Sinclair KD, Wilmot I (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3:155–163
172. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmot I, Sinclair KD (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27:153–154
173. Sinclair KD, Young LE, Wilmot I, McEvoy TG (2000) In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum Reprod* 15:68–86
174. Magnusson Å, Laivuori H, Loft A, Oldereid NB, Pinborg A, Petzold M, Romundstad LB, Söderström-Anttila V, Bergh C (2021) The Association Between High Birth Weight and Long-Term Outcomes—Implications for Assisted Reproductive Technologies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pediatr* 9:675775
175. Marconi N, Allen CP, Bhattacharya S, Maheshwari A (2022) Obstetric and perinatal outcomes of singleton pregnancies after blastocyst-stage embryo transfer compared with those after cleavage-stage embryo transfer: a systematic review and cumulative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 28:255–281
176. Liberman RF, Getz KD, Heinke D, Luke B, Stern JE, Declercq ER, Chen X, Lin AE, Anderka M (2017) Assisted Reproductive Technology and Birth Defects: Effects of Subfertility and Multiple Births. *Birth Defects Res* 109:1144–1153
177. Sperling CD, Kjaer SK, Hargreave M, Jensen A (2019) Risk of juvenile idiopathic arthritis among children conceived after fertility treatment: a nationwide registry-based cohort study. *Hum Reprod* 34:1139–1145
178. Fauque P, De Mouzon J, Devaux A, et al (2021) Do in vitro fertilization, intrauterine insemination or female infertility impact the risk of congenital anomalies in singletons? A longitudinal national French study. *Hum Reprod* 36:808–816
179. Kropp J, Di Marzo A, Golos T (2017) Assisted reproductive technologies in the common marmoset: an integral species for developing nonhuman primate models of human diseases†. *Biol Reprod* 96:277–287
180. Loi P, Fulka J, Ptak G (2003) Amphibian and mammal somatic-cell cloning: different species, common results? *Trends Biotechnol* 21:471–473

Parental ageing and Assisted Reproduction Technologies: analysis of risk of chronic diseases in the progeny

Maria Florencia Heber, Hafsa Gulzar, Richard Musson, Simona Bisogno, Kinga Fic, Grażyna Ewa Ptak ✉

Małopolska Center of Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków

✉corresponding author: g.ptak@uj.edu.pl

Key words: parental age, Assisted Reproduction Technologies (ART), placenta, metabolic alterations cardiovascular disease, epigenetic programming, embryo

SUMMARY

Conception of a child at advanced parental age (> 35 years) has been steadily increasing in recent decades, especially in developed countries. Socio-economic factors, effective contraceptives, and the availability of Assisted Reproduction Technologies (ART) have a direct impact on postponing the decision to have a baby. ART enables reproductive success for people diagnosed as infertile or with reduced possibilities of becoming pregnant due to concomitant pathologies. Epidemiological studies indicate that both advanced parental age and ART are associated with pathologies of pregnancy, such as gestational diabetes, risk of pre-eclampsia, miscarriage, placental abruption, preterm labor, stillbirth, neurodevelopmental disorders and chronic disease of the offspring. In our work, we will focus on the available information on metabolic changes that increase the risk of developing cardiovascular diseases in the offspring of parents at an advanced age and conceived through ART. Finally, we will address the sources of the observed disturbances at the gamete and embryo level, related to oxygen stress, epigenetic modifications and DNA damage, considering possible rescue actions.

