

STANISŁAW CEBRAT

Uniwersytet Wrocławski

Pytania o bariery w zapłodnieniu pozaustrojowym

Wstęp

Pierwszego, udanego zapłodnienia pozaustrojowego u ssaków, które doprowadziło do urodzenia się żywego królika, dokonano we wczesnych latach pięćdziesiątych dwudziestego wieku. Pierwszy człowiek urodził się dzięki technologii zapłodnienia pozaustrojowego dwadzieścia pięć lat później i żyje już ponad 30 lat, a autor tego eksperymentu otrzymał nagrodę Nobla w 2010 roku. Szacuje się, że do tej pory urodziło się dzięki tym technikom około cztery miliony dzieci. Pomimo tego, że zapłodnienie pozaustrojowe można by zakwalifikować, jako eksperyment biologiczny na niespotykaną do tej pory skalę, to wszelkie opracowania statystyczne na temat wyników tego eksperymentu kończą się formułą, że „dalsze badania nad stanem zdrowia dzieci poczętych drogą zapłodnienia pozaustrojowego są niezbędne”. Dlaczego jest tak, że po kilkunastu milionach przeprowadzonych cykli, które zakończyły się urodzeniem czterech milionów dzieci, nadal nie wiemy, jaki jest wpływ stosowania procedury *in vitro* na status genetyczny tych dzieci i pulę genetyczną całej populacji człowieka?

W potocznym języku polskim przyjęto dla określenia technik zapłodnienia pozaustrojowego termin „*in vitro*”. Ponieważ znaczy on „w szkle” i w wielu dziedzinach nauk biologicznych jest on używany właśnie w dosłownym znaczeniu – „w probówce (szklanej)”, więc bardziej właściwym będzie używanie ogólnego określenia – *ART*, akronimu z języka angielskiego – Assisted Reproductive Technology (technologia wspomaganiej reprodukcji). Ten termin jest coraz częściej używany zamiennie z terminem *IVF* – od: In Vitro Fertilization (zapłodnienie *in vitro*). Innym terminem, który będzie używany w tekście jest *ICSI* – od: IntraCyttoplasmic Sperm Injection (wstrzykiwanie plemnika do cytoplazmy komórki (jajowej)).

Bariery reprodukcyjne i dylemat Haldane’a

W 1957 roku Haldane sformułował twierdzenie, określone później terminem „Dylematu Haldane’a”, w którym poddaje w wątpliwość możliwość ewoluowania biosfery [Haldane, 1957]. Analizując liczbę nagromadzonych różnic między strukturami bliskich gatunków stwierdził, że liczba różnic wprowadzanych od czasu rozejścia się linii filogenetycznych tych gatunków i eliminowanych przez selekcję musiała być tak ogromna, a śmiertelność osobników z tymi eliminowanymi wersjami tak wysoka, że sukces ewolucyjny, mierzony

frakcją osobników przeżywających do czasu rozrodu musiałby być zbyt znikomy, aby populacje przeżyły [Haldane, 1957]. Ten dylemat został przeformułowany na tak zwany „Molekularny Dylemat Haldane’a” po analizie liczby mutacji na poziomie DNA, różniących poszczególne bliskie sobie gatunki. Istnieje kilka hipotez tłumaczących te paradoksalne wnioski, a raczej tylko „łagodzących” je. Jedna z nich zakłada, że selekcja nie testuje wszystkich możliwych wersji organizmów potomnych – pewne przestrzenie zmienności w ogóle nie są sprawdzane, ponieważ prawdopodobieństwo pojawienia się organizmu o danym zespole cech jest niezwykle niskie. Te niesprawdzone przypadki to osobniki, których przeżycie byłoby niezwykle mało prawdopodobne – to po co je w ogóle tworzyć? Selekcja może też eliminować organizm bardzo niskimi kosztami ewolucyjnymi – bardzo wcześnie po poczęciu, w przypadku organizmów wyżej zorganizowanych. Takie mechanizmy selekcji, zgodnie ze swoją naturą, mogą być przyczyną wielu przypadków bezpłodności. ART stara się je ominąć, doprowadzając do poczęcia w sytuacjach, gdy Natura ograniczała podjęcie takich prób.

Przyczyny kwalifikowania par do procedur ART

Pierwotnym zamierzeniem stosowania technologii zapłodnienia pozaustrojowego było umożliwienie posiadania dziecka przez pary niepełne. Szybko jednak ta grupa potencjalnych klientów została poszerzona o inne osoby lub pary, którym proponuje się te procedury. Mówiąc o naturalnych barierach łamanych przez ART, należy jednak rozważyć oddzielnie stosowanie tych metod w przypadku par niepełnych oraz w pozostałych sytuacjach.

Pary, kwalifikowane do procedury ART mogą być niepełne z powodu niedoborów po stronie kobiety, mężczyzny, lub z przyczyn warunkowanych przez obu partnerów. Proste wyliczenie wskazuje, że gdyby częstości występowania niepełności u mężczyzn i kobiet były takie same i wynosiły na przykład po 7%, to prawdopodobieństwo wystąpienia pary, w której oboje partnerzy byłiby niepełni wyniosłoby $0,07 \times 0,07 = 0,0049$, czyli niespełna pół procenta. Dane przedstawiane przez kliniki stosujące ART wskazują jednak na wielokrotnie wyższą częstość występowania niepełności u obojga partnerów [raport CDC 2008]. Nawet przyjmując, że w tej grupie znajdują się pary, w których oboje partnerzy są pełni, ale tworzą parę, która z innych przyczyn, na przykład immunologicznych nie może mieć dzieci, to danych tych nie można uznać za prawdziwe.

Niepełność może być cechą wrodzoną lub nabytą. Nawet jeżeli przyjmiemy, że wszystkie przypadki nabytej niepełności w żadnym stopniu nie są dziedziczne, to należy jednak przyjąć, że co najmniej część niedoborów wrodzonych ma podłoże genetyczne. Pokonując

bariery niepłodności stwarzamy możliwość przeniesienia tych defektów genetycznych na następne pokolenie. Najprostszym przykładem takiego przeniesienia jest bezpłodność mężczyzny spowodowana mikrodelecją w chromosomie Y. Szacuje się, że do kilkudziesięciu procent bezpłodnych mężczyzn to nosiciele takich właśnie defektów. U mężczyzn tych można jednak znaleźć, stosując biopsję jąder, poronne produkty mejozy – haploidalne komórki przypominające plemniki. Jeżeli takimi plemnikami uda się zapłodnić komórkę jajową metodą ICSI i urodzi się syn, to musi on odziedziczyć co najmniej ten defekt, który był bezpośrednią przyczyną bezpłodności jego ojca. Wydawałoby się, że taki efekt ART jest praktycznie nieszkodliwy, skoro potrafimy go już teraz tak łatwo ominąć. Tym bardziej będzie można go ominąć u przedstawiciela następnej generacji. Należy jednak zastanowić się nad dalszymi skutkami tej procedury. Jeżeli kilka procent mężczyzn w populacji jest obecnie bezpłodnych z tego powodu, to stało się to przecież w czasie jednej generacji, ponieważ do tej pory te defekty prowadzące do niepłodności nie mogły być przenoszone do kolejnych generacji. Jeżeli ta frakcja mężczyzn przeniesie defekty na następną generację, to zostaną one dodane do kilku procent nowych defektów z tej następnej generacji. W ten sposób płodność populacji (mężczyzn) będzie spadać bardzo szybko. Do tej pory Natura skutecznie zapobiegała takiemu kumulowaniu się bezpłodności.

Opisany przypadek genetycznego warunkowania niepłodności jest jednak najmniej niebezpiecznym, z punktu widzenia zdrowia dziecka. Zaburzenia w produkcji gamet bywają również powodowane defektami genetycznymi, które w istotny sposób mogą wpłynąć na rozwój zarodka i organizmu. Do takich defektów genetycznych należą tak zwane zrównoważone translokacje genetyczne. Są to przemieszczenia fragmentów DNA w obrębie tego samego chromosomu lub różnych chromosomów. Często nie prowadzą one do ilościowej zmiany informacji w genomie, w którym się zdarzyły. Żaden gen nie musi zostać uszkodzony i osoba z taką translokacją może funkcjonować zupełnie normalnie, nie zdając sobie nawet sprawy ze zmiany genetycznej. Jeżeli jednak doszłoby w czasie mejozy do rekombinacji między chromosomem z translokacją a chromosomem normalnym, to z bardzo dużym prawdopodobieństwem doszłoby do powstania gamety niezrównoważonej – z nadmiarem lub z niedoborem informacji genetycznej. Taka gameta nie mogłaby utworzyć normalnej zygoty. We wstępnych fazach mejozy, prowadzącej do powstania gamet, dochodzi jednak do rozpoznania nieprawidłowej struktury – chromosom z translokacją nie pasuje do swojego homologicznego chromosomu. Brak dopasowania jest sygnałem do zaniechania wchodzenia komórki w dalsze fazy mejozy, zaniechania produkcji gamet i zrezygnowania z

reprodukcji. Można ten mechanizm uznać za jeden ze sposobów unikania problemów opisywanych w dylemacie Haldane'a. W Naturze stanowi on barierę, która uniemożliwia wyprodukowanie gamety z niezrównoważoną translokacją, która mogłaby doprowadzić do powstania organizmu i tak skazanego na późniejsze wyeliminowanie przez selekcję. Techniki ART, w szczególności ICSI skutecznie omijają te bariery, prowadząc do utworzenia zarodków z defektywnych gamet [Oliver-Bonet i współpr., 2002]. Eksperymenty przeprowadzone na ponad 1500 ludzkich(!) zarodkach wykazały, że nasienie mężczyzny, które posiada obniżoną możliwość zapładniania komórek jajowych w zawieszynie, również ma obniżoną możliwość zapłodnienia ich poprzez bezpośrednie wstrzykiwania plemnika do cytoplazmy komórki jajowej [Van der Westerlaken i współpr., 2006]. Świadczy to o skorelowaniu upośledzenia wnikania plemnika do komórki, z obniżoną możliwością formowania biologicznie prawidłowej zygoty. Przełamanie upośledzenia wnikania plemnika przez zastosowanie ICSI nie łamie jednak upośledzenia w formowaniu prawidłowej zygoty.

Istnieją jeszcze inne naturalne bariery płodności, które są łamane przez ICSI. Jedną z najczęściej występujących monogenowych chorób genetycznych w populacji europejskiej jest mukowiscydoza. Jest ona powodowana recesywnym defektem w genie CFTR, odpowiadającym za produkcję białek kanałów jonowych w błonach komórkowych. Skutkiem uszkodzenia genu są zaburzenia w wydzielaniu wielu gruczołów, nawet potowych. Najbardziej niebezpieczne jest zagęszczenie śluzu wydzielanego przez komórki nabłonkowe układu oddechowego, przez co nabłonek migawkowy nie jest w stanie go skutecznie usuwać. Do bardzo poważnych należą również zaburzenia wydzielnicze trzustki. Jeszcze do niedawna dzieci dotknięte mukowiscydozą przeżywały najwyżej kilkanaście lat. Teraz żyją dłużej dzięki skutecznym sposobom leczenia objawowego. Znanych jest wiele defektów w genie CFTR, a niektóre z nich, te bardziej łagodne, nawet w układzie homozygotycznym nie prowadzą do wczesnej śmierci, ale hamują rozwój nasieniowodów. Mężczyzna homozygotyczny z tego typu defektem w genie CFTR jest bezpłodny, ale nie sterylny, ponieważ produkuje plemniki. Stosując biopsję jąder można pobrać plemniki i doprowadzić do zapłodnienia komórki jajowej. Te plemniki – wszystkie – niosą jednak defekt w genie CFTR. Jeżeli kobieta, dawca komórki jajowej, jest nosicielką defektu w CFTR (w naszej populacji 1 osoba na 25 jest nosicielem), to prawdopodobieństwo poczęcia dziecka z mukowiscydozą wynosi 50%. To nowo narodzone dziecko będzie jednak miało najprawdopodobniej ostrzejszą formę mukowiscydozy niż ojciec, ponieważ mutacje, które

prowadzą do poważnych defektów są częstsze i defekt wprowadzony przez komórkę jajową będzie miał najprawdopodobniej taką postać.

Kwalifikowanie par płodnych do procedur ART

Wcześniej wspomniano, że pierwotnym zamierzeniem stosowania ART były próby zaspokojenia potrzeby posiadania dzieci przez pary niepłodne. W miarę rozwoju technik genetycznych i technologii przechowywania i badania zarodków ofertę ART skierowano również do innych par. Między innymi są to pary, w których oboje partnerzy są nosicielami tego samego recesywnego defektu genetycznego – jak w przypadku opisanej powyżej mukowiscydozy. Takiej parze oferuje się badanie preimplantacyjne zarodków i eliminację zarodków z defektywnymi genami CFTR. Należy zwrócić uwagę na niespójność argumentacji: z jednej strony ART oferuje swoje usługi homozygotycznym mężczyznom, z niewykształconymi nasieniowodami z powodu defektu w CFTR, kiedy to defekt w genie jest obecny w każdym plemniku i jest wprowadzany do zygoty z prawdopodobieństwem 100%, a z drugiej strony, innym parom oferuje się eliminację zarodków heterozygotycznych z takimi defektami.

Inne przypadki par i osób, którym oferuje się usługi ART to:

- wystąpienie dominującego genu letalnego u jednego z partnerów, lub recesywnego defektu na chromosomie płciowym X,
- propozycja preimplantacyjnego badania na występowanie częstych w danej populacji defektów genetycznych i selekcja zarodków,
- uzyskanie struktury antygenowej (płodu) dziecka odpowiedniej dla transplantacji tkanki,
- spełnienie wymagań rodziców co do genetycznego statusu dziecka, na przykład wybór płci lub innych jego cech,
- przełożenia ciąży na okres późniejszy, bardziej sprzyjający rodzicom,
- sędowanie procesu (obowiązku) ciąży na inną kobietę.

Większość z tych propozycji wiąże się z wprowadzaniem metod eugenicznych – prób wpływu na pulę genetyczną człowieka poprzez eliminowanie defektywnych alleli, albo przez wprowadzenie alleli uznawanych za pozytywne. Część z nich to jedynie spełnienie życzeń partnerów, które wcale nie muszą być zgodne z naturalnymi warunkami rozwoju płodu i dziecka. Nie będziemy się tymi problemami zajmować, bo chociaż budzą one wiele wątpliwości co do biologicznego sensu ich wprowadzania, to budzą one więcej emocji natury etycznej i moralnej. Prawo niektórych państw europejskich ograniczyło już jednak możliwość

przeprowadzania badań preimplantacyjnych i stosowania ich wyników w celach eugenicznych oraz korzystania z usług matek zastępczych (surogatek).

Zaburzenia piętnowania rodzicielskiego

Gamety przekazują do zygoty, oprócz informacji genetycznej zawartej w chromosomach, informację zwaną epigenetyczną o tym, skąd się wziął w zygocie dany chromosom – od matki, czy od ojca. Ta informacja jest używana przez przyszły organizm do modyfikowania aktywności genów, zależnie od ich pochodzenia. Tak więc, jakiś gen pochodzący od matki może być wyciszony – nieaktywny, a odpowiadający mu allel na chromosomie ojcowskim może być aktywny. Ten mechanizm prowadzi do powstania dwóch pod-programów aktywujących informację genetyczną – mateczną i ojcowską, stąd nazwa piętnowania matecznego i ojcowskiego. Te dwa pod-programy pasują do siebie i po nałożeniu dają kompletny program prawidłowego rozwoju organizmu. Warunki hodowli tkankowych *in vitro* powodują zaburzenia w programach piętnowania. Jest to kłopotliwy problemem w hodowlach komórek macierzystych pochodzenia embrionalnego, kiedy eksperymentatorowi szczególnie zależy na zachowaniu nienaruszonego programu rozwoju omnipotentjalnych komórek.

Niestety, na ten sam problem napotyka się również w czasie zapłodnienia pozaustrojowego, co prowadzi do zaburzeń w rozwoju organizmu i występowania zespołów Beckwitha-Widemenna, Angelmana i innych defektów wynikających z błędów w piętnowaniu rodzicielskim. Prawdopodobnie defekty w piętnowaniu może wywoływać już samo hormonizowanie kobiety wywołujące wielojajczkowanie. Dlatego też z dużą ostrożnością należałoby podchodzić do prób prowadzenia dojrzewania komórek jajowych w warunkach *in vitro*. Te próby zakładają znacznie dłuższe przebywanie komórek poza naturalnym środowiskiem, w warunkach, w których tylko niektóre parametry są kontrolowane.

Zespoły chorobowe związane z zaburzeniami piętnowania rodzicielskiego występują po ART do 9 razy częściej niż po naturalnym zapłodnieniu [Sutcliffe i współpr., 2006]. Podstawy tych defektów nie są dobrze poznane, nie można wykluczyć, że są one wynikiem uszkodzenia samego systemu modyfikującego DNA w procesie piętnowania. Niektórzy obrońcy technologii ART argumentują, że te defekty nie są powodowane samą metodą ART, ale są wynikiem niedoborów rodziców związanych z ich bezpłodnością albo ze zbyt wydłużonym oczekiwaniem na dziecko, bądź nawet z ich wiekiem. Z punktu widzenia prawdopodobieństwa przenoszenia defektów na kolejne pokolenia, ta argumentacja nie ma znaczenia – ART zezwala na pojawienie się defektów w kolejnej generacji, pomimo że Natura stworzyła odpowiednie bariery. Należy jednak poddać w wątpliwość tę argumentację,

ponieważ analogiczne defekty stwierdza się w hodowlach komórkowych *in vitro* oraz w przypadkach pozaustrojowego zapłodnienia bydła, kiedy to nie stosuje się technik wspomaganego rozrodu z powodu jego bezpłodności.

Wady wrodzone i genetycznie warunkowane

Liczne badania wykazują, że występowanie wad wrodzonych po ART jest statystycznie istotnie częstsze niż po naturalnym poczęciu. Autorzy tych badań podkreślają jednak fakt, że informacje na temat statusu zdrowotnego dzieci po ART można uzyskać jedynie z badań retrospektywnych, ponieważ nie prowadzi się właściwych rejestrów dzieci. Informacje na temat tak zwanego sukcesu zapłodnienia *in vitro* najczęściej dotyczą utrzymania ciąży do 10 tygodnia lub, co najwyżej, żywo urodzonego dziecka, jak w raportach CDC (Centre for Disease Control and Prevention) w Stanach Zjednoczonych. W tych raportach brak jest informacji o statusie zdrowotnym dzieci. Aby uzyskać informacje na temat zagrożeń związanych z zapłodnieniem pozaustrojowym należy więc sprawdzić, jakim sposobem zostało poczęte chore dziecko i szacować liczbę wszystkich dzieci poczętych drogą *in vitro* w całej badanej populacji. W takich badaniach prowadzonych przez CDC [Reefhuis i współpr., 2008] stwierdzono, że w przypadku ciąż pojedynczych, wrodzone wady serca występowały - 2,1 razy częściej po ART niż po naturalnym poczęciu; rozszczepienie wargi i/lub podniebienia: 2,4 razy częściej; atrezja przełyku: 4,5 razy częściej; atrezja odbytu: 3,7 razy częściej. W tej samej pracy autorzy informują o znacznie ważniejszej sprawie; na 1296 dzieci, 2,9% procent dzieci z wieloma wadami genetycznymi urodziło się po ART, a w innych badaniach, na 8263 – 2.3% z pojedynczymi wadami genetycznymi urodziło się po ART. Jeżeli w tej populacji mniej niż 1% dzieci rodziło się po ART, to wniosek jest oczywisty - te wyniki wskazują, że mamy do czynienia z istotnie zwiększoną częstością wad determinowanych genetycznie – zwiększoną częstością mutacji.

O zwiększonej częstości mutacji w procesie ART mogą również świadczyć wyniki analiz występowania siatkówczaka u dzieci. Siatkówczak (retinoblastoma) jest nowotworem dna oka, pojawiającym się najczęściej do piątego roku życia. Nowotwór jest powodowany defektem w genie RB1. Jest to tak zwany supresor onkogenu. Mutacja w nim ma charakter recesywny – obydwa allele w komórce muszą być uszkodzone, aby mogło dojść do procesu nowotworzenia. Wyróżnia się dwie formy tego nowotworu - tak zwaną postać rodzinną, jeżeli defektywny gen został przekazany w gamecie przez jednego z rodziców, albo sporadyczną, gdy defekt pojawił się w czasie rozwoju płodowego. W przypadku postaci rodzinnej, już w zygocie pojawia się jeden defektywny allel. Aby doszło do nowotworzenia, musi dojść do

utrąty tego drugiego – prawidłowego allelu. Zdarza się to czasem w procesie podziału komórkowego na skutek błędu w rozdziale chromosomów do komórek potomnych. W rezultacie komórka może mieć dwa te same chromosomy od jednego rodzica. Jeżeli był to chromosom z mutacją recesywną – to mutacja ta staje się widoczna. Jeżeli jest to komórka siatkówki, to zaczyna się rozwijać siatkówczak. Jest oczywistym, że im wcześniej pojawia się pierwszy defekt w komórce zarodkowej, tym większe jest prawdopodobieństwo, że dojdzie do utraty drugiego allelu właśnie w linii komórek prowadzących do wykształcenia siatkówki. W przypadku odziedziczonego defektu, występuje on już w zygocie i do nowotworu dochodzi z prawdopodobieństwem do 95% i to w obu gałkach ocznych. Około połowy przypadków siatkówczaka to jego postać rodzinna. Druga połowa to postać sporadyczna, kiedy to pierwsza mutacja w genie RB1 pojawia się dopiero w czasie rozwoju zarodka. W tej postaci nowotwór pojawia się często tylko w jednej gałce ocznej. Częstość występowania każdej z tych postaci to około 1:30 000 urodzeń. Badania retrospektywne przeprowadzane w Holandii, a następnie we Francji wykazały, że częstość występowania siatkówczaka po ART wynosi około 1:3 000 i nie stwierdzono wśród tych przypadków postaci rodzinnej [Moll i współpr., 2003, Viot i współpr., 2010]. Wynikałoby z tego, że częstość mutacji w czasie procesu ART rośnie około dziesięciokrotnie.

Nie ma żadnych przesłanek, które mogłyby wskazywać, że gen RB1 jest szczególnie wrażliwy na procesy mutagenezy w czasie procedury ART. Należy raczej przyjąć, że cała informacja genetyczna jest poddana zwiększonej presji mutacyjnej. Nasuwa się więc pytanie – dlaczego inne choroby genetyczne nie pojawiają się po ART dziesięciokrotnie częściej. Odpowiedź jest prosta – znakomita większość defektów genetycznych, to defekty recesywne. Aby doszło do ich ujawnienia, musi dojść do uszkodzenia obydwu alleli. W przypadku siatkówczaka komórka somatyczna, w której dochodzi do takiego zjawiska zaczyna wygrywać konkurencję z otaczającymi ją komórkami prawidłowymi, dochodzi do nowotworzenia i efekt jest widoczny. W przypadku innych genów, taka utrata heterozygotyczności prowadzi po prostu do śmierci tej komórki i efektu nie widać. Efekt będzie widoczny dopiero wtedy, gdy obydwa allele będą uszkodzone już w zygocie. Na ten efekt należy jednak poczekać do kolejnych generacji. Można więc przyjąć, że recesywne defekty genetyczne wprowadzane technologiami ART będą usuwane przez śmierć genetyczną w przyszłych pokoleniach. Symulacje komputerowe wykazują, że akumulowanie mutacji recesywnych w puli genetycznej populacji, na skutek zwiększonej presji mutacyjnej, może prowadzić do śmierci populacji [Cebrat i Stauffer, 2009].

Używanie technik zapłodnienia pozaustrojowego jest związane z całkowitym złamaniem naturalnych barier ograniczających losowy dobór gamet. Wiadomo, że plemniki różnią się bardzo istotnie nie tylko w szybkości poruszania się, ale również w trafności wyboru kierunku ruchu. Zwrócił na to uwagę już J. Testart, argumentując swoje wycofanie się z działalności w dziedzinie zapłodnienia pozaustrojowego człowieka. Ostatnie dane wskazują, że największa rodzina genów w naszym genomie, licząca około 1000 genów i pseudogenów, odpowiedzialna za produkcję receptorów węchowych, może być zaangażowana w procesy nielosowego doboru gamet. Nielosowy dobór gamet mógłby również tłumaczyć, przynajmniej częściowo, paradoks Haldane'a [Cebart i Stauffer, 2008]. Zjawisko rozpoznawania zawartości informacji genetycznej w procesach rekombinacji jest znane u wielu organizmów – już w świecie bakterii. Dlaczego nie miałyby być wykorzystywane w rozmnażaniu płciowym ssaków? Przyjęcie hipotezy doboru gamet tłumaczyłoby niezwykle rozrzutność w produkcji plemników. Jeżeli komórka jajowa miałaby wybierać najbardziej właściwy plemnik, to musiałaby mieć z czego wybierać... i ma. W prawidłowym, naturalnym procesie zapłodnienia na jedną komórkę jajową przypada do kilkuset milionów plemników. W procesie ICSI jest to jeden plemnik!

Bibliografia

1. Haldane, J.B.S., (1957), The Cost of Natural Selection, *J. Genet.* 55:511-524.
2. CDC (2008) Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2006 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National Summary and Fertility Clinic Reports, Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2008.
3. Sutcliffe, A.G., Peters, C.J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., Clayton-Smith, J., Brueton, L.A., Bannister, W., Maher, E.R., (2006) Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey. *Human Reproduction.* 21, 1009-11.
4. Oliver-Bonet M., Navarro1, J., Carrera, M., Egozcue, J., Benet, J., (2002) Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Molecular Human Reproduction* 8, 958–963.
5. Van der Westerlaken, L., Naaktgeboren, N., Verburg, H., Dieben, S., Helmerhorst, F.M., (2006) Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertility and Sterility.* 85, 395-400.
6. Sutcliffe, A.G., Peters, C.J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., Clayton-Smith, J., Brueton, L.A., Bannister, W., Maher, E.R., (2006) Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey. *Human Reproduction.* 21, 1009-11.

7. Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve L.A., Correa, A., Hobbs, C.A., Rasmussen, S.A. and The National Birth Defects Prevention Study, (2009) Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Human Reproduction*. 24, 360-366.
8. Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE., (2003) Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet*, 361:309–310.
9. Viot G., Epelboin, S., Olivennes, F., (2010) Is there an increased risk of congenital malformations after ART? Results from a prospective French long-term survey of a cohort of 15 162 children. *Human Reproduction*. 25 (suppl 1): i53-i55.
10. Cebrat S., Stauffer D., (2009) Influence of a small fraction of individuals with enhanced mutations on a population genetic pool *Int. J. Mod. Phys. C* 20 (8) pp. 1271-1280.
11. Cebrat S., Stauffer D., (2008) Gamete recognition and complementary haplotypes in sexual Penna ageing model *International Journal of Modern Physics C* 19 (2) pp. 259-265.