

# Wpływ *in vitro* i innych technik wspomaganego rozrodu na występowanie zaburzeń postnatalnych

Aleksandra Piątek<sup>1</sup>, \*Małgorzata Koziarska-Rościszewska<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Wydział Wojskowo-Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Dziekan Wydziału: prof. dr hab. n. med. Jurek Olszewski

<sup>2</sup>NZOZ Poradnia Lekarzy Rodzinnych Vitaplus, Łódź

Kierownik Poradni: dr n. med. Małgorzata Koziarska-Rościszewska

## THE IMPACT OF *IN VITRO* AND OTHER ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES ON POSTNATAL MALFORMATIONS

### Summary

**Introduction.** Infertility becomes an increasing problem of developed societies. Assisted Reproduction Technology (ART) makes having children possible. As a result of ART, higher occurrence of multiple pregnancies (26% compared to 2% for the general population) and premature births (2-fold higher), probably cause the higher incidence of cerebral palsy. The presence of other pathologies (digestive, reproductive, imprinting-related) is still pending and needs investigation.

**Aim.** Assessment of the global data on the effectiveness of ART and the occurrence of pathology in children conceived by this method.

**Materials and methods.** Analysis of 1978-2012 years' international data, determining the effectiveness of ART and their impact on the children health.

**Results and conclusions.** The effectiveness of ART increases. Intracytoplasmatic Sperm Injection results in pregnancy and deliveries – respectively 35.4% and 29% of cycles. Transferring several embryos enhances the chance of implantation and delivery rates. 53% of women decide to transfer 2 embryos. Cerebral palsy is significantly more often observed in ART children, which seems related to the prematurity and multiple pregnancy. Malformations of reproductive and gastrointestinal tract are also more common among ART children than in the general population. According to the analyzed data, the results of the impact of ART on the incidence of malformations are diversified. Even in similar populations some are contradictory. After adjusting maternal factors (age, smoking, causes of infertility, multiple pregnancies) it occurs that imprinting – related diseases, ocular and nervous system malformations have similar occurrence as in general population. The further research is necessary.

Key words: ART, IVF, ISCI, defects, risk

### WPROWADZENIE

W 2010 r. przyznano nagrodę Nobla Robertowi Edwardsowi za wieloletnie badania, które „uczyniły możliwym leczenie niepłodności”. Nowa era rozpoczęła się 25.07.1978 r. z narodzinami Louise Brown, pierwszego „dziecka z probówki” (1). Z danych Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) wynika, że w USA w 2002 r. 2% kobiet w wieku rozrodczym odbyło w związku z niepłodnością co najmniej jedną konsultację u lekarza w ciągu roku, a kolejne 10% leczyło się z powodu niepłodności przynajmniej raz w życiu. W przypadku ok. 7% par, w których kobieta była w wieku rozrodczym, pomimo braku stosowania antykoncepcji przez 12 miesięcy, kobieta nie zaszła w ciążę (co spełnia definicję niepłodności) (2). W Polsce dzięki Technikom Wspomaganego Rozrodu (*Assisted Reproductive Technology* – ART) rodzi się rocznie około 4,5 tys./300 tys. dzieci (1,5% ogółu narodzin).

Badania przeprowadzone w 2007 r. w 18 europejskich krajach wskazują, że w populacji 425,6 mln osób wykonano prawie 380 tys. cykli ART (3).

Zapłodnienie naturalne występuje około 14 dnia, w okresie owulacji, w czasie 28-dniowego cyklu. Wówczas oocyt jest uwalniany z jajnika i trafia do jajowodu. Podczas stosunku 50-200 mln plemników dostaje się do dróg rodnych, ale tylko kilkaset z nich osiąga bańkę jajowodu, gdzie w większości przypadków dochodzi do zapłodnienia. Zygota implantuje się w ciągu 6-12 dni w trzonie macicy (4).

ART polegają na pozaustrojowym zapłodnieniu komórki jajowej i przeniesieniu zarodka do jamy macicy lub wprowadzeniu do jamy macicy odpowiednio przygotowanego nasienia.

### TECHNIKI WSPOMAGANEGO ROZRODU (5-7)

1. Zapłodnienie *in vitro* z transferem zarodka (*In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* – IVF-ET), etapy:

- Terapia hormonalna – hiperstymulacja owulacji. Początkowo stosuje się analogi gonadoliberyny (np. Diphereline, Decapaptyl), w drugim etapie – podskórnie preparaty gonadotropin (np. GONAL F, Pergoveris, Menopur). Gdy poziom estradiolu i wielkość pęcherzyków jest odpowiedni stosuje się lek wyzwalający owulację – podskórną iniekcję gonadotropiny kosmówkowej – *human Chorionic Gonadotropin* – hCG (np. Ovitrelle).
- Punkcja jajników – pobranie z pęcherzyków jajnikowych płynu z komórkami jajowymi, wykonywana w ciągu 36-40 godzin od podania hCG. Komórki jajowe umieszcza się w specjalnych odżywkach.
- Zapłodnienie pozaustrojowe – zapładnianie komórek jajowych przez wyselekcjonowane plemniki. Po 18-20 godzinach inkubacji ocenia się, ile oocytów uległo zapłodnieniu i ponownie inkubuje.
- Embriotransfer do jamy macicy – w 2-5 dobie. Polega na wprowadzeniu zarodków do jamy macicy wraz z małą ilością płynu hodowlanego.

## 2. Mikroinseminacja plemnika do cytoplazmy oocyty (*Intracytoplasmatic Sperm Injection* – ICSI).

Jest nowszą metodą, stosowaną od 1992 r. Przebieg cyklu jest podobny do IVF, ale zapłodnienie oocytów przeprowadza się poprzez wstrzyknięcie wyselekcjonowanych pod mikroskopem plemników.

Plemniki można pobierać z najądrza (*Pericuteaneous Epididymis Sperm Aspiration* – PESA) w przypadku np. braku nasieniowodów czy ejakulacji wstecznej. Gdy występuje hipoplazja komórek rozrodczych, można wykonać punkcję jądra z pobraniem plemników (*Testicular Sperm Extraction* – TESE).

## 3. Inseminacja domaciczna (*Intrauterine Insemination* – IUI).

Do jamy macicy wstrzykuje się odpowiednio przygotowane, oddane w dniu zabiegu nasienie. Pacjentka jest poddawana terapii hormonalnej stymulującej jajczkowanie. Metody:

- inseminacja wewnątrzmaciczna nasieniem pobranym od męża (*Intrauterine Insemination with semen from a Husband* – IUI-H),
- inseminacja wewnątrzmaciczna nasieniem pobranym od anonimowego dawcy (*Intrauterine Insemination with semen from an Anonymous donor* – IUI-D). Potencjalni dawcy są badani przez lekarza. Muszą być fizycznie i psychicznie zdrowi, bez wad genetycznych.

Gdy kobieta nie może w danym czasie być poddana zabiegowi, bądź gdy uzyska się więcej zarodków niż przewidywano, stosuje się zamrażanie zarodków w ciekłym azocie. Wykorzystuje się je do kolejnego sztucznego zapłodnienia – transferu mrożonych zarodków (*Frozen Embro Replacement* – FER).

Polski Nadzór Krajowy d/s Ginekologii i Położnictwa dopuszcza możliwość przekazania do adopcji zamrożonych embrionów innej parze za zgodą rodziców.

## CEL PRACY

Celem pracy jest analiza i usystematyzowanie danych związanych ze skutecznością ART oraz z częstością

występowania patologii u dzieci poczętych tą metodą, ze szczególnym uwzględnieniem występowania wad wrodzonych.

## MATERIAŁ I METODA

Dokonano analizy danych pochodzących z czasopism z lat 1978-2012, umieszczonych w elektronicznej bazie danych *National Center for Biotechnology Information* – NCBI. Opisano przebieg i skuteczność ART oraz porównano występowania zaburzeń i chorób u dzieci urodzonych w wyniku zastosowania ART.

## WYNIKI

W latach 2002-2007 zaobserwowano wzrost skuteczności metod ART. W najnowszych badaniach europejskich szansa na implantację zarodka wynosi 33,2%, a na urodzenie dziecka 28,2% przy zastosowaniu IVF. Szanse są nieznacznie wyższe przy ICSI (odpowiednio 35,4 i 29%) – metody coraz częściej wykorzystywanej z powodu skuteczności i możliwości zastosowania w męskiej niepłodności. W okresie 3 lat (2004-2007) proporcja zabiegów ICSI/IVF wzrosła o 21%. Większe szanse na implantację i urodzenie dziecka daje transfer kilku embrionów. Najwięcej kobiet decyduje się na przeniesienie do jamy macicy 2 zarodków – 53%. Mniej na wprowadzenie 3 zarodków – 23%, i 1 zarodka – 21%.

## DYSKUSJA

### Częstość narodzin z ART

Badanie oceniające prawie 500 tys. cykli ART przeprowadzonych w 33 europejskich krajach w 2007 r. wykazało, że najczęściej stosuje się metody ICSI (52%) i IVF (24,5%). Ilość wykonywanych zabiegów inseminacji domacicznej w badaniach przeprowadzonych w 23 krajach wykazała 5-krotnie częstsze przeprowadzanie zabiegów IUI-H niż IUI-D (3).

Najwięcej urodzeń dzieci z ART było w Danii (4,9%) i Belgii (4,5%) w stosunku do wszystkich urodzeń. Stosunkowo małą liczbę wykazano w Turcji (0,5%) i Czarnogórze (0,8%) (3). Natomiast wg danych z USA z 2009 r. – 1,1%, przy czym w okresie 1995-2005 liczba ta wzrosła ponad 2,5-krotnie (2).

### Liczba ciąż i urodzeń żywych w stosunku do zapłodnień

Według badań europejskich obserwuje się wzrost liczby udanych implantacji zarodków (ciąż) w stosunku do przeprowadzonych cykli. Wynosił on 43,5% (2006) w stosunku do 41,9% z poprzedniego roku (2005) dla badań europejskich (8). Różnica jest także między poszczególnymi metodami zapłodnień. Urodzenia żywe w 2006 r. stanowiły w metodach IVF – 21,5%, ICSI – 18,4%, FER – 12,7%, a metodami IUI – 12,8% (IUI-H) i 14,4% (IUI-D) (8).

Wraz z wiekiem matek zmniejsza się szansa na prawidłowe zapłodnienie i utrzymanie ciąży, co skutkuje również restrykcjami w refundacjach zabiegów ART w niektórych krajach (tab.1). Do pozytywnych zjawisk

Tabela 1. Zależność skuteczności ART (odsetek ciąży i poródów) w zależności od wieku matki (9).

Wiek matki	Ciąża	Poród
< 35	28,20%	26,60%
35-39	22,20%	20,50%
40 i więcej	9,60%	8,60%

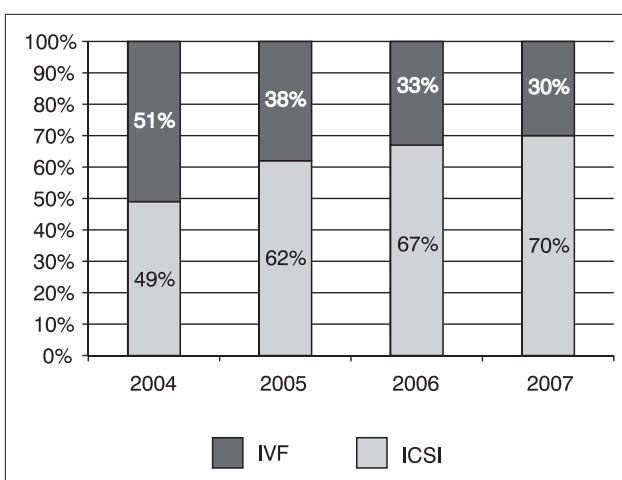
należy niewielki, choć stały wzrost liczby ciąży po zapłodnieniach ART (tab. 2 i 3) (3, 8-11).

Należy zauważyć, że wg badań europejskich obserwuje się stały i szybki wzrost liczby przeprowadzonych zabiegów ICSI w stosunku do IVF (ryc. 1). Wybór metody ICSI jest korzystny nie tylko ze względu na podobny wskaźnik zajścia w ciążę w porównaniu do metod IVF, ale głównie z powodu częściowego rozwiązania problemu niepłodności męskiej.

### Ciąże pojedyncze i mnogie

W zależności od czasu, miejsca, zakresu badania można otrzymać bardzo zróżnicowane wyniki dotyczące częstości ciąży i urodzeń mnogich. Pewne jest natomiast, że występują częściej przy sztucznych zapłodnieniach.

Badania wykonane w Arabii Saudyjskiej w latach 2003-2007 wykazały większą liczbę płodów przypadających na jedną ciążę wśród kobiet zapłodnionych metodą ICSI w porównaniu do grupy kontrolnej (kolejno  $1,34 \pm 0,57$  vs  $1,01 \pm 0,12$ ) i urodzeń żywych ( $1,28 \pm 0,49$  vs  $1,01 \pm 0,12$ ); bliźnięta stanowiły odpowiednio 24,51 vs 1,43%, ciążę trójaczę 3,95 vs 0% dzieci urodzonych po zapłodnieniu naturalnym (12). W badaniach Bergha ciążę mnogie stanowiły 27% urodzeń, a częstość ich występowania w populacji stanowiła 1% (13). Zaobserwowano znacznie większą liczbę ciąży mnogich przy ICSI (42%) niż IVF (18%) (14), ale u kobiet po 40. roku życia ich odsetek był niższy (8).



Ryc. 1. Proporcja zabiegów ICSI do IVF [%] w latach 2004-2007.

Transfer wielu zarodków wiąże się z większą szansą urodzenia, ale też z powikłaniami wynikającymi z ciąży mnogiej. W badaniach belgijskich wykazano, że bliźnięta są bardziej zagrożone gorszymi wynikami okołoporodowymi w porównaniu do dzieci z ciążą pojedynczych. Bliźnięta tej samej płci miały wyższy wskaźnik śmierci okołoporodowej, wcześniactwa i małej wagi urodzeniowej niż bliźnięta różnej płci (15).

W sztucznych zapłodnieniach metodami IVF i ICSI ponad 20% stanowią ciążę mnogie (16) (tab. 4). Jest to związane z liczbą zarodków transferowanych jednorazowo do jamy macicy (ryc. 2). Amerykańskie badania retrospektywne z lat 1996-1997 wskazują na znacznie mniejszą liczbę ciąży pojedynczych przy zastosowaniu ART niż w populacji – stanowią zaledwie 43%, 44% – bliźniacze, 12% – trójacznych, przy czym 1% stanowią ciążę z czterema lub większą liczbą płodów (17).

Obserwuje się częstsze zakończenie ciąży z ART poprzez cięcie cesarskie. Według badań australijskich w latach 2003-2005 średnia częstość urodzeń dzieci

Tabela 2. Odsetek ciąży po zapłodnieniach ART metodami IVF, ICSI i FER w latach 2003-2007 (3, 8-11).

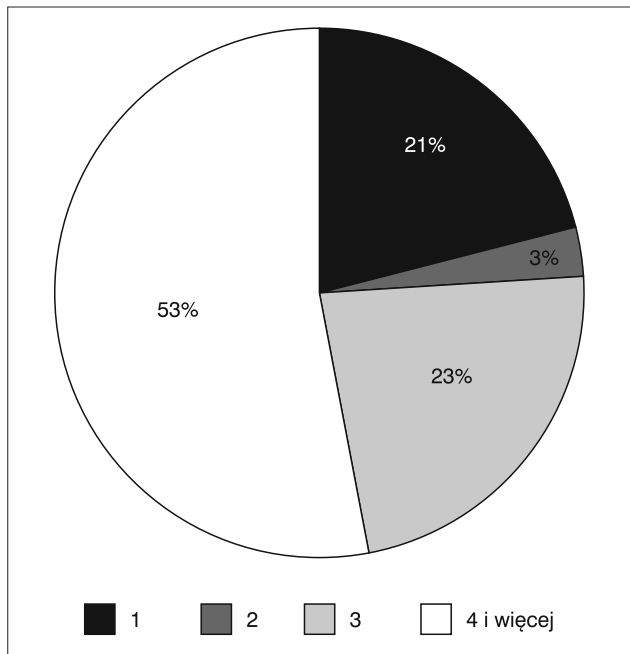
Metoda	2003	2004	2005	2006	2007
IVF	26,10%	26,60%	26,90%	28,90%	29,10%
ICSI	26,50%	27,10%	28,40%	29,90%	28,60%
FER	x	x	17,30%	19,10%	20,10%

Tabela 3. Skuteczność metod ART – odsetek ciąży/urodzeń dziecka w zależności od metody IVF, ICSI lub FER w Polsce i w Europie w 2007 r. (3).

	IVF – odsetek ciąży/urodzeń [%]	ICSI – odsetek ciąży/urodzeń [%]	FER – odsetek ciąży/urodzeń [%]
Polska	33,2/28,2	35,4/29,0	20,9/16,0
Europa	29,1/21,1	28,6/20,2	20,1/13,5

Tabela 4. Liczba dzieci urodzonych z jednej ciąży z zapłodnień IVF i ICSI w latach 2002-2007 (3, 8-11, 16).

Liczba dzieci (IVF+ICSI)		2002	2003	2004	2005	2006	2007
1		75,5	76,7	77,3	78,2	79,2	77,7
Mnoga	2	23,2	22	21,7	21	19,9	21,3
	3	1,3	1,1	1	0,8	0,9	1
Mnoga razem		24,5	23,1	22,7	21,8	20,8	22,3



Ryc. 2. Liczba zarodków transferowanych do jamy macicy podczas jednego cyklu.

za pomocą cesarskiego cięcia wyniosła 50,1% z IVF vs 28,9% dla populacji ogólnej. Najczęściej wykonywano je po zapłodnieniu z transferem jednego zarodka do jamy macicy (*single embryo transfer – SAT*), najczęściej w ciążach bliźniaczych i przy wykorzystaniu nasienia dawcy i komórek jajowych od kobiet „dawczyń” (18). Liczba ciąż przy SAT jest nieznacznie mniejsza niż przy przeniesieniu większej liczby embrionów, a ryzyko powikłań związanych z ciążą mnogą spada znacznie (19).

### Wcześnieactwo

Wcześnieactwo definiuje się jako urodzenie się dziecka między 22 a 37 tygodniem ciąży.

W duńskich badaniach retrospektywnych z lat 1997-2001 zaobserwowano 1,5-1,9-krotnie zwiększoną częstość występowania wcześniactwa u dzieci kobiet, u których przez rok starań nie doszło do zapłodnienia naturalnego (20). W badaniach Kovurovej z lat 1990-1995 problem ten dotyczył 31,5% dzieci z ART w porównaniu do 7,8% dzieci z populacji ogólnej (21). Wg Hvidtjørna 18% dzieci z IVF jest wcześniakami, a tylko 4% w populacji urodzonej w wyniku naturalnego zapłodnienia (22). Jeszcze większą różnicę: 26 vs 2% wykazują badania Allena dotyczące wcześniactwa i obniżonej wagi urodzeniowej u dzieci z IVF (23). Uważa się, że czas porodu zależy także od liczby płodów w ciąży (tab. 5). W badaniu Bergha wcześniactwo dotyczyło 30,3% dzieci z IVF (vs 6,3% w grupie kontrolnej) (13). Amerykańskie badania z lat 1996-1997 nie wykazały jednak znacznej różnicy czasu porodu między ciążami z IVF a naturalnymi (39,1 tydzień vs 39,5 tydzień) (17).

### Patologie ciąży

Do patologii występujących u matek, u których przeprowadzane były techniki wspomaganego rozrodu, należą: stan przedzucawkowy, rzucawka, krwotok przedporodowy, przedterminowy poród, potrzeba chirurgicznej pomocy przy porodzie.

### Śmiertelność okołoporodowa dzieci

Śmiertelność okołoporodowa jest 5-6-krotnie większa u bliźniąt, niż przy ciąży pojedynczej (24). Badania Bergha mówią o wyższej śmiertelności noworodków w stosunku do populacji ogólnej (0,65 vs 0,4%) i częstszej hospitalizacji w okresie noworodkowym (21). Badania przeprowadzone w Szwecji wykazały, że przy użyciu

Tabela 5. Termin porodu w ciążach pojedynczych i mnogich (bliźniaczych i trojacznych) z ART3.

Termin porodu (tydzień ciąży)	Procent urodzeń		
	cięża pojedyncza	bliźnięta	trojaczki
Ekstremalnie przedwczesny (20-27)	0,8%	2,6%	7,4%
Bardzo przedwczesny (28-32)	2,5%	11,0%	37,4%
Przedwczesny (33-36)	8,7%	39,3%	43,9%

metody IVF jest 20-krotnie większa szansa ciąży mnogiej w porównaniu do populacji ogólnej, co również ma wpływ na niższą przeżywalność płodów (25).

### Wyniki okołoporodowe u dzieci

W zależności od ośrodka, populacji i dodatkowych czynników, badania albo wskazują na brak korelacji z zaburzeniami, albo na częstsze występowanie niektórych z nich. Badania przeprowadzone w Arabii Saudyjskiej nie wykazały znamiennej różnicy między występowaniem wad wrodzonych w grupie zapłodnienia ART i grupie kontrolnej (12). W badaniu norweskim nie wykazano znacznych różnic w wadze urodzeniowej, wieku ciążowym i występowaniu przedwczesnych porodów między dziećmi z ART a populacją ogólną (26). Badania belgijskie uwzględniające długość ciąży, skalę Apgar, zaburzenia u noworodków, śmierć okołoporodową i wady wrodzone także wykazały brak znaczących różnic we wszystkich parametrach (15).

### Aberracje chromosomowe

Zgodnie z koncepcją selekcji gamet (najlepsze możliwe dopasowanie oocyta i plemnika, ograniczające zapłodnienie mniej zgodnych przez np. ich niższą żywotność) ciąży po ICSI powinny prowadzić do wyższego ryzyka anomalii niż zapłodnienie naturalne. Nie zostało to jednak potwierdzone badaniami. Macica jest narządem, w którym także występują mechanizmy selekcji – występowanie zaburzeń autosomalnych u płodu prowadzi do poronień. Aneuploidie chromosomów płciowych (zaburzenia ilości materiału genetycznego w jądrze komórkowym, mogące skutkować wystąpieniem chorób genetycznych) można zaobserwować częściej, ponieważ mają mniejszą tendencję do wywoływania poronień. Nie udowodniono jednak, by były one związane z ART (27). Według badań Aboulghara 3,5%, czyli 15/430 dzieci urodzonych z ICSI miało aberracje w kariotypie, podczas gdy w grupie kontrolnej żadne (28). Wykazano, że 463/1000 poronień miało związek z błędami chromosomowymi, a wraz z wiekiem matki rosło prawdopodobieństwo trisomii u dzieci (29). Zwrócono uwagę na różnice długości ciąży w porównaniu z grupą kontrolną: wcześniactwo 8,7 vs 4,3%; obniżoną masę urodzeniową 6,4 vs 4%; nieletalne uszkodzenia płodu 2,6 vs 2,1% (23).

### Występowanie wad wrodzonych

Dane dotyczące częstości występowania wad wrodzonych są zróżnicowane. Ocenia się, że przy zapłodnieniu ICSI u 1-13% urodzonych występują malformacje, w IVF – u 2-9%, a przy naturalnym zapłodnieniu u 2-13% (przy czym większość badań wskazuje 4,9% jako górną granicę). Może to być związane z chromosomalnymi zaburzeniami użytych gamet, lekami użytymi do stymulacji płodności, iniekcji plemnika do oocyta (opiera się ono bowiem na ominięciu naturalnych barier i może powodować wprowadzenie ciał obcych, np. medium hodowlanego) (30). Według danych retrospektywnych z lat 1989-2002 z USA ryzyko występowania wad krążeniowo-naczyniowych i mięśniowo-szkieletowych wynosiło 6,2%

u dzieci z IVF, z IUI – 5,8%, podczas gdy przy naturalnym zapłodnieniu – 4,4% (31). W badaniu Bergha malformacje występowały u 5,4% dzieci z IVF, wykazując 1,39-krotnie większą częstość występowania w porównaniu z ogólną populacją. Wyższy także był wskaźnik umieralności okołoporodowej – ok. 1,9% dzieci z IVF vs 1,1% w populacji ogólnej (13).

### Predyspozycje intelektualne

Interesujących danych dostarczyło badanie przeprowadzone przez belgijską psycholog Lizę Leunens na 151 dzieciach z ICSI i grupie kontrolnej 153 dzieci (grupy dobrane pod względem wieku, płci, wykształcenia matki). Według badania zdolności motoryczne wypadły porównywalnie. Zdolności matematyczne, wystawiania się, pamięci i sprawności umysłowej były nieznacznie wyższe u dzieci z ICSI, które osiągały średni wynik 112 w porównaniu do 107 próby kontrolnej (32).

### Najczęstsze wady u dzieci z ART

W amerykańskim badaniu retrospektywnym z lat 1997-2003 wykazano częstsze występowanie wad zastawek i przegrody sercowej w grupie dzieci z ART i w porównaniu do dzieci urodzonych bez metod wspomaganego rozrodu. Po uwzględnieniu dodatkowych czynników związanych z uwarunkowaniami rodzinnymi zaobserwowano w grupie dzieci z ciąż pojedynczych częstsze występowanie wad przegrody sercowej, rozszczep wargi, atrezję przełyku, odbytowo-odbytniczą i częstsze występowanie spodziectwa.

U dzieci z ART z mnogimi wadami zaobserwowano częstsze występowanie zespołów wad: kręgow (vertebral anomalies), atrezje odbytu (anal atresia), wrodzone wady serca (cardiac abnormalities), przetoki tchawiczowo-przełykowe (tracheo-esophageal fistula), atrezje przełyku (esophageal atresia), wady nerek lub dysplazje kości promieniowej (renal abnormalities, radial dysplasia) oraz wad kończyn (limb abnormalities) znane jako zespoły VACTER lub VACTERL. Stwierdzono także częstsze występowanie zespołu Goldenhara (zespół oczno-uszno-kręgowy) charakteryzującego się jednostronną hipoplazją połowy struktur twarzoczaszki, a także anomaliami kręgow, układu sercowo-naczyniowego i nerwowego (33). Fińskie badania 304 dzieci z IVF i 569 z grupy kontrolnej wykazują 4-krotnie częstsze występowanie wad wrodzonych serca u dzieci z IVF.

### Niska waga urodzeniowa

Niska waga urodzeniowa (< 2500 g) występuje częściej u dzieci z ART – 27,4 vs 4,6% w populacji ogólnej. Może być związana z większą liczbą płodów. Świadczy o tym jej częstość: 43,8% u bliźniąt i 8,9% dla ciąż pojedynczych dzieci z IVF (13). Z kolei w odniesieniu do populacji, biorąc tylko pod uwagę donoszone ciąży (≥ 37 tygodnia), niska waga urodzeniowa była 2,6 razy częstsza u dzieci z ART, z czego: niska (< 2,5 kg) – 3,5% urodzeń; bardzo niska (< 1,5 kg) – 4,3% urodzeń; u pojedynczych płodów – 13,2%; u czworaczek – prawie

100%; dla bliźniaków ryzyko obniżonej wagi podobne do populacyjnego (17).

Biochemicznym wytłumaczeniem niskiej wagi urodzeniowej jest wpływ ludzkiej menopauzalnej gonadotropiny (*Human Menopausal Gonadotropin* – HMG) użytej w przebiegu procedur ART, powodującej podwyższenie poziomu białka wiążącego czynnik insulinopodobny 1 (*Insulin-Like Growth Factor-Binding protein1* – IGFBP-1) i ograniczenie wzrostu wewnątrzmacicznego. Inną przyczyną mogą być zmienione poziomy innych białek endometrium, czy też wady strukturalne łożyska, a także pośredni mechanizm – występowanie spowodowanego ciążą nadciśnienia tętniczego u matki.

Jednocześnie istnieje tendencja do rozwiązywania ciąży przez cięcia cesarskie, przyspieszające termin porodu.

### **Choroby związane z imprintingiem**

Imprinting jest to tzw. „naznaczenie genetyczne” zachodzące podczas gametogenezy. Polega na metylacji obszaru genu pochodzącego od jednego z rodziców. Obszar ten jest wyciszony (nie podlega translacji), przez co obserwuje się ekspresję genów tylko od drugiego rodzica. Może to prowadzić do nadekspresji lub zbyt małej ekspresji niektórych genów, co z kolei prowadzi do wad wrodzonych lub nowotworów (31). Inną zmianą prowadzącą do chorób z imprintingu jest modyfikacja histonów, jednak jej znaczenie jest mniej zbadane (34).

### **Zespół Beckwitha-Wiedemanna (BWS)**

Jest zaburzeniem wzrostu związanym z błędną metylacją lub uniparentalną (ojcowską) dysomią chromosomu 11p15. W tym *locus* znajdują się tam dwie domeny odpowiedzialne za wzrost. Objawy kliniczne mogą być bardzo różne. Nie zawsze są zauważalne cechy pierwotnie opisane przez Beckwitha i Wiedemanna czyli wytrzeszcz, makroglosja i gigantyzm. Wzrost i waga są w okolicy 97 centyla, podczas gdy głowa – ok. 50 centyla. Do innych objawów należą przepuklina pępowinowa, rozejście mięśni prostych brzucha czy organomegalia (np. hepatomegalia). Płodowa hipertrofia komórek kory nadnerczy jest patognomoniczna dla zespołu. Częste są też dysplazja kory nerek, kamica nerkowa czy wapnica nerek (35). Wyższa jest zachorowalność na nowotwory embrionalne – guz Wilmsa, hepatoblastoma, guz kory nadnerczy czy mięsaka prądkowano-komórkowego (36). W 2003 r. został opublikowany przez De Baun opis 7 przypadków BWS u dzieci z ART – 2 urodzonych po IVF, 5 po ICSI. Oszacowano, że dzieci z ART stanowią 4,6% wszystkich chorych na BWS, czyli ponad 6-krotnie więcej niż wynikałoby z częstości urodzeń w wyniku sztucznego zapłodnienia (37).

W badaniu brytyjskim (38) opisano 6 przypadków związanych z ART wśród 149 pacjentów chorych na BWS (3 przypadki IVF i 3 ICSI). Francuskie badania (39) wykazały, że 6 przypadków ze 149 zdiagnozowanych pacjentów było urodzonych z ART (4 z IVF, 2 z ICSI

i jeden przypadek z FER). Częstość ART w populacji dzieci z BWS wynosiła 4%, czyli znacznie więcej niż we francuskiej populacji (1,3%).

Badania przeprowadzone w Szwecji (40) na grupie ponad 16 tys. dzieci urodzonych w latach 1989-2001, z których żadne nie chorowało na BWS, a także z Danii (41), gdzie spośród dzieci urodzonych w latach 1995-2001, 6052 było urodzonych po IVF, a ponad 440 tys. naturalnie poczętych, nie wykazały jednak związku między metodami ART a BWS.

### **Zespół Angelmana (AS)**

Zespół jest spowodowany utratą funkcji macierzystego genu UBE3A (najczęściej mikrodelecja na chromosomie 15q11-13). Charakteryzuje się mikrocefalią, poważnym opóźnieniem umysłowym, brakiem mowy, innym wzorem EKG, napadami padaczki, urywanymi ruchami i częstym śmianiem się bez powodu, przez co był określany jako „zespół szczęśliwej marionetki”. Innymi cechami fenotypu zachowania są radosny nastrój, nadaktywność, problemy z koncentracją uwagi i problemy ze snem, a także sensoryzmy (widoczne w zachowaniu przejawy zaburzeń w odbieraniu i przetwarzaniu bodźców zmysłowych, wynikające z nadwrażliwości lub niedowrażliwości), w szczególności fascynacja wodą. Objawy wskazujące na chorobę ujawniają się w drugiej połowie pierwszego roku życia (42-44).

W badaniach Coxa opisano dwa przypadki AS po zapłodnieniu ICSI z powodu niepłodności męskiej. Występowanie przypadków AS związanych z imprintingiem jest dosyć rzadkie, ocenia się je na 4-6% wszystkich przypadków, przez co ocenia się ich występowanie na 1/300 000 osób (43). Kolejne doniesienia pojawiły się w 2003 r., opublikowane przez Ørstavika. Przypadek dotyczył dziewczynki urodzonej dzięki ICSI. W przeciwieństwie do poprzednich przypadków analiza nasienia ojca nie wykazała zaburzeń. Zaburzenia w rodzinie były związane z jej matką i matką matki, u których występowały spontaniczne poronienia i wewnątrzmaciczne obumarcia płodu sugerujące defekty oogenezy (45). Brytyjskie badania (Sutcliffe, 2006) wykazały, że wśród 75 chorych na AS, troje dzieci było urodzonych dzięki technikom wspomaganego rozrodu. Podobne wyniki uzyskano w badaniach holenderskich (Doornbos, 2007) – 6 z 63 chorych było urodzonych z ART. Podobnie w badaniach niemieckich (Ludwig, 2005) – 4 z 16 chorych stanowiły dzieci z ART (34).

W ostatnim z nich częstość występowania AS była podobna u dzieci osób, które mimo problemów z płodnością nie przeszły kuracji hormonalnej, co może świadczyć o braku wpływu leków na występowanie zespołu. Ale według innych badań ryzyko jest 2-krotnie większe u dzieci osób leczonych hormonalnie i po zapłodnieniach ICSI ze względu na możliwość dojrzewania „gorszych” oocytów. Również zbyt szybkie dojrzewanie oocytów uważa się za czynnik sprzyjający metylacji rejonów DNA (42, 45).

Wyniki badań skandynawskich zaprzeczają związkowi sztucznego zapłodnienia z imprintingiem. Według

Lidegaard na 25 tys. dzieci ART, żadne nie miało zespołu Angelmana (40). Przy częstości występowania AS w populacji 1/10-20 tys. nie można znaleźć związku między tą chorobą a sztucznymi zapłodnieniami.

#### **Inne choroby z imprintingu**

Nie zaobserwowano żadnych powiązań między ART a przemijającą cukrzycą noworodków, zespołem Pradera-Williego, Silvera-Russela, zespołem odmatczynej hipometylacji, siatkówczaka (34).

#### **Patologie wzroku**

Szwedzkie badania retrospektywne z lat 1982-2007 dotyczące wrodzonych wad oczu wykazały, że występują one u 0,11% dzieci z ART. Uwzględniając czynniki ze strony matki (wiek, palenie papierosów, BMI), nie zaobserwowano znamiennej częstości występowania niż u dzieci urodzonych naturalnie. Według danych z lat 1985-2005 ciężkie wady wzroku zaobserwowano u 0,1% dzieci z ART. Ich występowanie było wyższe niż w populacji ogólnej, a nawet uwzględniając ww. czynniki, ryzyko spadło jedynie nieznacznie. Różnica nie jest znamienna statystycznie i nie dowodzi związku zaburzenia z technikami wspomaganego rozrodu (46).

#### **Patologie neurologiczne**

W szwedzkich badaniach retrospektywnych z lat 1982-1997 przeanalizowano dane ponad 9 tys. dzieci z IVF i porównano do populacji wynoszącej prawie 1,7 mln osób. Wykazano 3-krotnie częstsze występowanie wad cewy nerwowej. Rozszczep rdzenia i bezmózgowie obserwowane były rzadziej ze względu na wczesne wykrywanie zaburzeń dzięki badaniom USG w 16. tygodniu ciąży (14). Bezmózgowie stwierdzano 2-krotnie częściej u dzieci z ciąż bliźniaczych, rozszczep rdzenia – jednakowo częsty u dzieci z ciąż pojedynczych i bliźniaczych (14). Przy ciążach mnogich zaobserwowano częstsze występowanie porażenia mózgowego. Bliźnięta mają 5-krotnie większe ryzyko, trójaczki – 17-krotnie większe niż w ciążach pojedynczych (25).

Ryzyko dla bliźniąt wynosi 1-5%, 8% – dla trójaczek, 42,9% – dla czworaczek (47).

Mózgowe porażenie dziecięce (MPD) jest określeniem grupy zespołów związanych uszkodzeniem niedojrzałego jeszcze mózgu. Występują zaburzenia ruchowe i często upośledzenie umysłowe. Prawie połowa to dzieci urodzone przedwcześnie. Bliźnięta mają 4-krotnie większe ryzyko ze względu na występujące u nich zaburzenia – zespół przetoczenia krwi między płodami (*Twin-to-Twin Transfusion Syndrom* – TTTS), ciąża jednokosmówkowa czy rozbieżność mas urodzeniowych. Wśród dzieci urodzonych w terminie czynnikiem ryzyka jest wzrost < 10 centyla w stosunku do wieku ciążowego (*Small for Gestational Age* – SGA).

Wyniki opublikowane przez Hvidtjørna (22), Lidegaard (40) oraz Stromberga (48) wykazały silną korelację ART z występowaniem MPD. Ale w innych skandynawskich badaniach MPD nie występowało częściej niż w grupie kontrolnej (u dzieci z ciąż pojedynczych, jak i

bliźniaczych z ART częstość występowania wynosiła 0,3 vs 0,4% u bliźniąt z grupy kontrolnej) (50).

#### **Patologie przewodu pokarmowego**

U dzieci z IVF zaobserwowano trzykrotnie częstsze występowanie atrezji przewodu pokarmowego – przełyku, jelita cienkiego lub odbytu (13, 14). Również ryzyko przepukliny pępowinowej rosło, szczególnie przy metodzie ICSI (14). Niemieckie badania retrospektywne z lat 1997-2011 wykazały znamiennej większą częstość występowania malformacji odbytowo-odbytniczych (*anorectal malformations* – ARM). W grupie 295 dzieci 30 było urodzonych dzięki metodom wspomaganego rozrodu. Najczęściej występowały u nich przetoki kroczowe (36%), przetoki odbytniczo-cewkowe (24%) i odbytniczo-pęcherzowe (5%). Izolowane ARM stanowiło łącznie 45% przypadków i było rzadsze u dzieci urodzonych za pomocą technik wspomaganego rozrodu (27%) niż w grupie kontrolnej (47%). U 22% pacjentów (20%) dzieci z ART i 22% dzieci z grupy z niewspomaganego zapłodnienia występowały zespoły VATER lub VACTERL (49).

#### **Patologie układu rozrodczego u dzieci**

Do patologii należą występowanie genetycznych czynników męskiej niepłodności – wrodzony obustronny brak nasieniowodów (*Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens* – CBAVD) występujący przy mutacji genu CFTR. Może występować jako objaw mukowiscydozy bądź stanowić osobne zaburzenie. Inny przykład stanowią mikrodelecje na chromosomie Y odpowiedzialne za niepłodność ok. 5-15% mężczyzn z azospermią lub ciężką oligospermią (17). U bezpłodnych mężczyzn jest dziesięciokrotnie większe prawdopodobieństwo wystąpienia aneuploidii (17). Możliwe wytłumaczenie to uszkodzenia podczas zabiegu ICSI, hormonalne środowisko *in vitro*, geny plejotropowe powodujące uszkodzenie nasienia i wady aneuploidalne. Podczas zabiegu zarodek może być narażony na działanie czynników mechanicznych, termicznych i chemicznych, które mogą wpłynąć na wyniki przeprowadzonych badań (49). Ryzyko wystąpienia spodziectwa w IVF jest jak w populacji ogólnej. Natomiast w ICSI jest o 50% większe – może to być związane z ojcowską niepłodnością, genetycznym obciążeniem zmianami układu rozrodczego (13, 14).

#### **WNIOSKI**

W różnych badaniach przeprowadzanych na podobnych populacjach wyniki i wnioski były niekiedy skrajnie różne. Dlatego w przypadku braku pewności wpływu ART na występowanie patologii należy uwzględnić możliwe powiązania z wiekiem matki, ciążą mnogą lub przyczynami niepłodności rodziców.

Według wielu badań u dzieci z ART znamiennej częściej obserwuje się mózgowe porażenie dziecięce, co wiąże się z wcześniactwem i urodzeniem się z ciążą mnogą. Innymi patologiami częstszymi u dzieci z ART

są wady wrodzone układu rozrodczego (spodzieństwo u chłopców z ICSI), pokarmowego (atrezja przełyku i odbytowo-odbytnicza) oraz sercowo-naczyniowego (wady przegrody i zastawek sercowych).

Po uwzględnieniu czynników mających potencjalny wpływ na występowanie zaburzeń u dzieci nie wykazano znamiennej częstszego występowaniu chorób z imprintingu (zespół Beckwitha-Wiedemanna, zespół Angelmana), zaburzeń wzroku, wrodzonych wad oczu ani zaburzeń układu nerwowego.

Kobiety poddające się zabiegowi są często starsze niż zachodzące w ciążę naturalnie. Istnieją różne przyczyny ich niepłodności, wpływające na występowanie zaburzeń u dzieci. Należy również uwzględnić czynniki zewnętrzne mogące wpłynąć na zarodek podczas przeprowadzania zabiegu.

Ważnym aspektem jest czas powstania metody. Najstarsze dziecko z *in vitro* urodziło się dopiero 35 lat temu. Nie można więc jeszcze w pełni ocenić wpływu ART na występowanie chorób u osób dorosłych.

Konieczna jest kontynuacja badań. □

## Piśmiennictwo

- Stepoe PC, Edwards RG: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2(8085): 366.
- Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2009 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National Summary and Fertility Clinic Reports. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2011.
- De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S et al.: Assisted reproductive technology in Europe, 2007. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012; 27(4): 954-966.
- Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR: Time of implantation of the Conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 1796-1799.
- Kurczuk-Powolny A: *In vitro* i inne metody wspomaganego rozrodu. [www.gazeta.pl](http://www.gazeta.pl), akces: 11.12.2012.
- Stymulacja hormonalna jajników – przebieg leczenia niepłodności (IVF-ET). [www.artvimed.pl](http://www.artvimed.pl), akces: 11.12.2012.
- Dębski R, Pisarski T, Rzempoluch T et al.: Stanowisko polskiego towarzystwa ginekologicznego dotyczące technik wspomaganego rozrodu. [www.spin.org.pl](http://www.spin.org.pl), akces: 11.12.2012.
- De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S et al.: Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2010; 25(8): 1851-1862.
- Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S et al.: Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2009; 24(6): 1267-1287.
- Nyboe Andersen A, Goossens V, Ferraretti A et al.: Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008; 23(4): 756-771.
- Nyboe Andersen A, Goossens V, Gianaroli L et al.: Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1513-1525.
- Al-Fifi S, Al-Binali A, Al-Shahrani M et al.: Congenital anomalies and other perinatal outcomes in ICSI vs. naturally conceived pregnancies: a comparative study. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26: 377-381.
- Bergh T, Ericson A, Hillensjö T et al.: Deliveries and children born after *in vitro* fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet* 1999; 354: 1579-1585.
- Ericson A, Källén B: Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study. *Hum Reprod* 2001; 16(3): 504-509.
- Ombelet W, Peeraer K, De Sutter P et al.: Perinatal outcome of ICSI pregnancies compared with a matched group of natural conception pregnancies in Flanders (Belgium): a cohort study. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(2): 244-253.
- Nyboe Andersen A, Gianaroli L, Felberbaum R et al.: Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2006; 1(7): 1680-1697.
- Schieve L, Meikle S, Ferre C et al.: Low and Very Low Birth Weight in Infants Conceived with Use of Assisted Reproductive Technology. *N Engl J Med* 2002; 346: 731-737.
- Sullivan E, Chapman M, Wang Y, Adamson G: Population-based study of cesarean section after *in vitro* fertilization in Australia. *Birth* 2010; 37(3): 184-191.
- Alukal J, Lamb D: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) – what are the risks? *Urol Clin North Am* 2008; 35(2): 277-288.
- Basse O, Baird DD: Infertility and preterm delivery, birthweight, and Caesarean section: a study within the Danish National Birth Cohort. *Hum Reprod* 2003; 18(11): 2478-2484.
- Koivurova SM, Hartikainen AL, Gissler M et al.: Neonatal outcome and congenital malformations in children born after *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 2002; 17(5): 1391-1398.
- Hvidtjorn D, Grove J, Schendel D et al.: Cerebral Palsy Among Children Born After *In Vitro* Fertilization: The Role of Preterm Delivery – A Population-Based, Cohort Study. *Pediatrics* 2006; 2(118): 475-482.
- Allen C, Bowdin S, Harrison RF et al.: Pregnancy and perinatal outcomes after assisted reproduction: a comparative study. *Ir J Med Sci* 2008; 177(3): 233-241.
- Hazekamp J, Bergh C, Wennerholm UB et al.: Avoiding multiple pregnancies in ART: consideration of new strategies. *Hum Reprod* 2000; 15(6): 1217-1219.
- Peterson B, Nelson K, Wilson Z, Stanley F: Twins, triplets and cerebral palsy in births in Western Australia in the 1980s. *Br Med J* 1993; 307: 1237-1243.
- Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A et al.: Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet* 2008; 372: 737-743.
- Koullischer L, Verloes A, Lesenfants S et al.: Genetic risk in natural and medically assisted procreation; Early Pregnancy 1997; 3: 164-171.
- Aboulghar H, Aboulghar M, Mansour R et al.: A prospective controlled study of karyotyping for 430 consecutive babies conceived through intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001; 76(2): 249-253.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J et al.: A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980; 44: 151-178.
- Bertelsmann H, de Carvalho Gomes H, Mund M et al.: The Risk of Malformation Following Assisted Reproduction. *Dtsch Arztebl Int* 2008; 105(1-2): 11-17.
- Olson CK, Keppler-Noureuil KM, Romitti PA et al.: *In vitro* fertilization is associated with an increase in major birth defects. *Fertil Steril* 2005; 85(5): 1308-1315.
- Leunens L, Celestin-Westreich S, Liebaers I, Ponjaert-Kristoffersen I: Cognitive and motor development of 8-year-old children born after ICSI compared to spontaneously conceived children. *Hum Reprod* 2006; 21(11): 2922-2929.
- Reefhuis J, Honein M, Schieve L et al.: Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Hum Reprod* 2009; 24(2): 360-366.
- Owen CM, Segars JH Jr: Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Seminars in Reprod Med* 2009; 27(5): 417-428.
- Weksberg R, Beckwith J, Smith A, Shuman Ch: Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet* 2005; 137C: 12-23.
- Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O et al.: Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ10T1. *Hum Mol Genet* 2001; 10(26): 2989-3000.
- DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP: Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 156-160.
- Mahe ER, Brueton LA, Bowdin SC et al.: Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology. *J Med Gen* 2003; 40: 62-65.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J et al.: *In vitro* fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCNQ10T gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1338-1341.
- Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN: Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study. *Hum Reprod* 2005; 20(4): 950-954.
- Källén B, Finnström O, Nygren KG, Olausson PO: *In vitro* fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF



- fertilization methods. *Fertil Steril* 2005; 84(3): 611-617. **42.** Ludwig M, Katalinic A, Gross S et al.: Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005; 42(4): 289-291. **43.** Cox GF, Bürger J, Lip V et al.: Intracytoplasmic Sperm Injection May Increase the Risk of Imprinting Defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71(1): 162-164. **44.** Van Buggenhout G, Fryns JP: Angelman syndrome (AS, MIM 105830). *Eur J Hum Genet* 2009; 17(11): 1367-1373. **45.** Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB et al.: Another Case of Imprinting Defect in a Girl with Angelman Syndrome Who Was Conceived by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Am J Hum Genet* 2003; 72(1): 218-219. **46.** Tomqvist K, Finnström O, Bengt K et al.: Ocular Malformations or Poor Visual Acuity in Children Born After *In Vitro* Fertilization in Sweden. *Am J Ophthalmol* 2010; 150(1): 23-26. **47.** Yokohama Y, Shimizu T, Hayakawa K: Prevalence of cerebral palsy in twins, triplets and quadruplets. *Int J Epidemiol* 2005; 24: 943-948. **48.** Stromberg B, Dahlquist G, Ericson A et al.: Neurological sequelae in children born after *in vitro* fertilisation: a population-based study. *Lancet* 2002; 359: 461-465. **49.** Pinborg A, Loft A, Schmidt L et al.: Neurological sequelae in twins born after assisted conception: controlled national cohort study. *BMJ* 2004; 329: 311-314. **50.** Zwink N, Jenetzky E, Schmiedeke E et al.: Assisted reproductive techniques and the risk of anorectal malformations: a German case-control study. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 65.

nadesłano: 28.01.2013

zaakceptowano do druku: 01.03.2013

Adres do korespondencji:

\*Małgorzata Koziarska-Rościszewska  
NZOZ Poradnia Lekarzy Rodzinnych VitaPlus  
ul. Lumumby 3, 90-927 Łódź  
tel.: +48 502-590-890, +48 (42) 678-18-08  
e-mail: malgosiaro@op.pl