

Prof. dr hab. n. med Sławomir Wołczyński
Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Amiry Podolak

Ewaluacja wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich rozwój i potencjał implantacyjny

Promotor: prof. Krzysztof Łukaszuk,
Gdański Uniwersytet Medyczny

Funkcjonalna jakość zarodka, receptywność endometrium i transfer zarodków to kluczowe czynniki wpływające na sukces u pacjentów leczonych metodami rozrodu wspomaganego medycznie. Jednak możliwości w ocenie funkcjonalnej jakości zarodków są ograniczone i najczęściej polegają na wysoce subiektywnej ewaluacji morfologicznej i morfometrycznej przy wyborze zarodka do transferu. Genetyczna diagnostyka przedimplantacyjna pod kątem aneuploidii pozwala na wybór zarodków euploidalnych oraz poprawia wskaźniki implantacji i zmniejszenie odsetek poronień. Niestety duży odsetek euploidalnych transferowanych zarodków nie implantuje. Nowe nadzieje na poprawę możliwości wyboru zarodka do transferu przyniosła analiza kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA).

Mitochondria to wielofunkcyjne organelle, które odgrywają ważną rolę w produkcji energii, homeostazie wapnia i apoptozie. Powszechnie przyjmuje się, że oocyty o dużej liczbie mitochondriów mają większy potencjał rozwojowy do osiągnięcia stadium blastocysty niż te o niższych poziomach. Liczba kopii w oocytach wzrasta podczas wzrostu oocytów do około 200 000 kopii u ssaków. Prawdopodobnie mniejsza liczba mitochondriów wiąże się zasadniczo z mniejszą produkcją ATP, co powoduje niepowodzenia zapłodnienia i/lub nieprawidłowym rozwojem zarodka. Ta komórkowa elektrownia zapewnia dojrzewanie jądra i cytoplazmy, organizację wrzeciona kariokinetycznego, podziały, różnicowanie, tworzenie jamy blastocysty, wylęganie blastocysty z osłonki przejrzystej. Pierwsze prace z wykorzystaniem analizy

sekwencjonowania nowej generacji wykazały w komórkach trofektodermi, że wyższa zawartość kopii mtDNA w blastocystach wiąże się z aneuploidią i małą szansą na zajście w ciążę. W tematykę tych badań wpisuje się przedstawiona mi do recenzji praca mgr Amiry Podolak *Ewaluacja wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich rozwój i potencjał implantacyjny*.

Praca doktorska składa się z 3 opublikowanych prac i omówienia uzyskanych wyników.

- jednej pracy poglądowej:

Podolak, A.; Woclawek-Potocka, I.; Lukaszuk, K. The Role of Mitochondria in Human Fertility and Early Embryo Development: What Can We Learn for Clinical Application of Assessing and Improving Mitochondrial DNA? *Cells* 2022, 11, 797. IF: 6.600; MNiSW: 140.

- i dwóch prac oryginalnych:

Podolak, A.; Liss, J.; Kiewisz, J.; Puksza, S.; Cybulska, C.; Rychlowski, M.; Lukaszuk, A.; Jakiel, G.; Lukaszuk, K. Mitochondrial DNA Copy Number in Cleavage Stage Human Embryos—Impact on Infertility Outcome. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022, 44, 273-287. IF: 2.081; MNiSW: 70.

Lukaszuk, K.*; Podolak, A.* Does Trophectoderm Mitochondrial DNA Content Affect Embryo Developmental and Implantation Potential? *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5976. <https://doi.org/10.3390/ijms23115976> IF: 5.924, MNiSW: 140.

Opublikowane prace mają łączny IF: 14.605 i 350 punktów MNiSW. Recenzję ułatwia fakt, że wszystkie prace zostały już poddane recenzjom w pismach o wysokim IF.

We wstępie rozprawy mgr Amira Podolak krótko omawia podstawowe informacje dotyczące roli mitochondriów w rozwoju zarodka oraz opisuje mitochondrialny DNA. Doktorantka podjęła się w pracy oceny klinicznego znaczenia zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach w 3. oraz 5/6 . dobie po zapłodnieniu i zbadania korelacji z ploidią, morfologią embrionów, ich potencjałem rozwojowym oraz implantacyjnym, a także wiekiem matki. Doktorantka podjęła się ocenić możliwości wykorzystania oznaczeń mDNA jako niezależnego markera wyboru zarodka przy transferze w programie IVF.

Materiałem badanym były blastomery pobrane w 3 lub 5 dobie do diagnostyki przedimplantacyjnej w kierunku aneuploidii wszystkich chromosomów wykonanych w Laboratorium Genetycznym Medycznych Laboratoriów Diagnostycznych INVICTA dla pacjentów Klinik Leczenia Niepłodności INVICTA . Ocenę ewaluacji mtDNA dokonano

przeprowadzając ekstrapolację liczby odczytów dla mtDNA oraz nDNA. Diagnostykę PGT-A przeprowadzono przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji (NGS – ang. Next Generation Sequencing) po uprzedniej amplifikacji całego genomu (WGA – ang. Whole Genome Amplification). Umożliwiło to ocenę liczby odczytów w mtDNA oraz gDNA. Na podstawie powyższych parametrów Doktorantka mogła wyliczyć współczynnik mtDNA/gDNA określanego w literaturze jako tzw. „mitochondrial score”. Analizy liczby odczytów dokonano przy użyciu funkcji „Coverage Analysis” (V.5.12.0.0.) na serwerze Ion Torrent V.5.12.3. (Life Technologies). Obliczono względną zawartość mtDNA w badanych zarodkach, a uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej celem oceny korelacji uzyskanych wyników z wyżej opisanymi zmiennymi. Doktorantka zastosowała do tego analizy statystyczne: test U Manna-Whitneya oraz test zgodności chi kwadrat w programie Statistica StatSoft Inc. Polska. Wybrane zostały testy nieparametryczne, ponieważ rozkład wartości współczynnika mtDNA/gDNA dla zebranych grup zarodków charakteryzuje się dużą zmiennością i nie jest normalny. Wartość $p < 0.05$ uznawano za statystycznie znamienne. Ocena parametrów odbywała się w grupach badanych oraz kontrolnych, to znaczy zestawiane ze sobą były wartości wyżej wymienionego współczynnika, na przykład dla zarodków euploidalnych i aneuploidalnych, zarodków o potwierdzonej implantacji oraz niepowodzeniu implantacji, zarodków o dobrej i złej jakości morfologicznej w skalach oceny embriologicznej.

W pracy *The role of mitochondria in human fertility and early embryo development: what can we learn for clinical application of assessing and improving mitochondrial DNA?*; Podolak A.; Woclawek-Potocka I.; Lukaszuk K.; Cells 2022, 11, 797. Cells 2022, 11, 797 szczegółowo omówiono dotychczasową wiedzę o znaczeniu mitochondriów w rozwoju embrionalnym oraz potencjalnych możliwościach wykorzystania mtDNA w diagnostyce potencjału implantacyjnego zarodków.

W pracy *Mitochondrial DNA Copy Number in Cleavage Stage Human Embryos—Impact on Infertility Outcome*; Podolak, A.; Liss, J.; Kiewisz, J.; Pukszta, S.; Cybulska, C.; Rychlowski, M.; Lukaszuk, A.; Jakiel, G.; Lukaszuk, K.; Curr. Issues Mol. Biol. 2022, 44, 273-287, w wyniku przeprowadzonych analiz, Doktorantka stwierdziła jedynie zależność między zawartością mtDNA jedynie z ploidią zarodków (średnia wartość mtDNA w zarodkach euploidalnych 6.3 ± 7.5 , średnia wartość w zarodkach aneuploidalnych 7.1 ± 5.8 , $p = 0.004$). Według Doktorantki badanie nie pozwala na

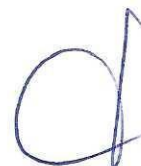


wyjaśnienie przyczyn takiego zjawiska, ale prawdopodobnie może wskazywać na wyższe zapotrzebowanie energetyczne zarodków aneuploidalnych.

W pracy *Does Trophectoderm Mitochondrial DNA Content Affect Embryo Developmental and Implantation Potential?* Lukaszuk, K.; Podolak, A.; *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5976 autorzy wykazali statystycznie znamiennej zależność pomiędzy zawartością mtDNA a ploidalnością embrionów oraz dniem biopsji wskazując na możliwy związek parametru z potencjałem rozwojowym zarodków. Nie obserwowali jednak statystycznie znamiennej korelacji analizowanego parametru z potencjałem implantacyjnym embrionów, co dowodzi niskiej wartości omawianego markera jako niezależnego narzędzia selekcji zarodków do transferu w procesie zapłodnienia *in vitro*.

Doktorantka wielokrotnie podkreśliła, że uzyskane do tej pory wyniki są sprzeczne z pracami niektórych autorów. W erze technologii „omicznych”, analizy morfokinetycznej poklatkowej, sztucznej inteligencji, algorytmów genetycznych, dużych zbiorów danych, nieinwazyjnego obrazowania metabolicznego i niezliczonych biomarkerów badanie żywotności zarodków jest ekscytujące, ale i bardzo trudne. Ocena, czy rozwijający się zarodek rzeczywiście ma potencjał rozwojowy pozostaje daleka od ideału. Jest mało prawdopodobne, że sama ocena mtDNA będzie w stanie rozwiązać zagadkę żywotności i potencjału rozwojowego i implantacyjnego zarodka. Pracę kończy sześć wniosków wynikających z przeprowadzonych badań:

1. Istniejąca zależność pomiędzy zawartością mtDNA i ploidalnością zarodków, zarówno na etapie zarodka 3-dniowego jak i 5- lub 6-dniowego, wskazuje na związek parametru z potencjałem rozwojowym embrionów.
2. Wyższy wskaźnik implantacji blastocyst z 5. doby w porównaniu do blastocyst z 6. doby, zaobserwowana zależność pomiędzy zawartością mtDNA a dniem biopsji blastocysty również wskazuje na związek analizowanego markera z potencjałem rozwojowym embrionów.
3. Zależność zawartości mtDNA w zarodkach z ich potencjałem implantacyjnym wskazuje na niską przydatność markera jako dodatkowego, niezależnego narzędzia selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego.
4. Ocena ilości mDNA nie może być użyta do oceny jakości zarodka lub jego płci oraz wieku matki, ponieważ nie istnieje zależność pomiędzy zawartością mtDNA a morfologią i płcią zarodków oraz wiekiem matki.



5. Duża zmienność otrzymywanych wyników zależnie od pobranego blastomeru może potencjalnie wynikać z asymetrycznej dystrybucji mitochondriów pomiędzy blastomerami, potwierdzonej znakowaniem fluorescencyjnym.
6. Niskie znaczenie kliniczne zawartości mtDNA w ocenie zarodków wynika z braku standaryzacji badań.

Jako recenzent uważam, że wnioski w opublikowanych pracach są zwarte i doskonale oddające, a w opracowaniu są zbyt opisowe.

Podsumowując, stwierdzam, że **mgr Amira Podolak** dysponuje doskonałym warsztatem metodycznym w zakresie biologii molekularnej i szeroką wiedzą w temacie prowadzonych badań i nie mam wątpliwości, że osiągnęła stopień dojrzałości naukowej uprawniającej do ubiegania się o stopień doktora. Dlatego uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest oryginalnym osiągnięciem Autorki oraz spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski określone w art. 187 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z dnia 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Amiry Podolak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie doceniając, że prace zostały opublikowane w czasopismach o wysokim indeksie cytowań i wysokiej punktacji MNiSW wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Amiry Podolak.

B-odh 31.10.2022

KIEROWNIK
KLINIKI ROZRODczości
i ENDOKRYNOLOGII GINEKOLOGICZNEJ

prof. dr hab. i. med. Sławomir Wołczyński